

UCH-FC
DOC-EBE
C282
C.L

FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO EN LA DETRITÓSFERA
DE UN BOSQUE TEMPLADO EN CHILOE: REGULACIÓN INTERNA Y
SU RELACIÓN CON EL PROCESO DE DESCOMPOSICIÓN

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias
Por

MARTÍN RUBÉN CARMONA ORTIZ

Mayo, 2004

Director de Tesis Dr. Juan J. Armesto Zamudio.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

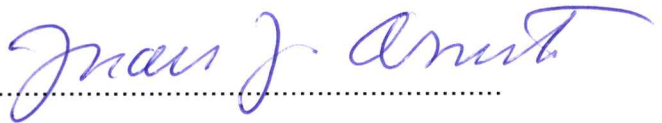
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MARTÍN RUBÉN CARMONA ORTIZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de Marzo de 2004.

Director de Tesis:

Dr. Juan Armesto Zamudio

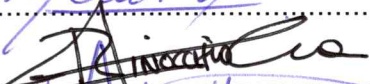

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

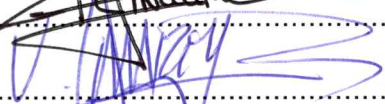
Dr. Margarita Carú


.....

Dr. Rosanna Ginocchio


.....

Dr. Víctor Marín


.....

Dr. Rodrigo Medel


.....

A mi Familia
A mi Pareja
A mis Amigos y Colegas
Y a los Viejos y Bellos Bosques Nativos de Chile

*“...voy perdido
en la más oscura
entraña de lo verde:
silban aves glaciales,
deja caer un árbol
algo que vuela y cae
sobre mi cabeza.*

*Estoy solo
en las selvas natales,
en la profunda
y negra Araucanía...*

*...Suena y se calla el bosque:
se calla cuando escucho,
suena cuando me duermo,
entierro
los fatigados pies
en el detritus
de viejas flores, en las defunciones
de aves, hojas y frutos,
ciego, desesperado...*

*...allí, en la luz sombría,
se decidió mi pacto con la tierra.”*

Un Mundo Enterrado

PABLO NERUDA

AGRADECIMIENTOS

Todo mi recorrido académico y este trabajo no habrían sido posibles sin el apoyo constante e incondicional de mis Padres y Hermanos, es por esto que les agradezco en primer lugar. Gracias a su cariño, paciencia y estímulo pude desarrollar mi interés en las ciencias biológicas y ecológicas. Agradezco a Dios por contar siempre con ellos.

Agradezco a mi Tutor Dr. Juan Armesto quien apoyó en forma constante mis estudios de postgrado, brindándome siempre el consejo adecuado y la orientación necesaria para mi formación como investigador. Gracias a él tuve la oportunidad de participar en apasionantes proyectos científicos y no científicos que fortalecieron mi vocación, incluyendo mi trabajo en la Fundación "Senda Darwin" que fue y sigue siendo mi segundo "Hogar Académico". Además, por su gestión obtuve apoyo económico en los momentos más críticos de mi formación de postgrado.

Agradezco a los miembros de la comisión de evaluación de tesis, Dra. Margarita Carú, Dra. Rosanna Ginocchio, Dr. Víctor Marín y Dr. Rodrigo Medel por su apoyo y por las certeras correcciones y comentarios que realizaron en el proyecto de tesis y manuscrito final.

Agradezco a los Doctores Cecilia Pérez y Juan Carlos Aravena, quienes en la práctica actuaron como mis Co-Tutores, apoyándome incondicionalmente en los trabajos de terreno, laboratorio y contribuyendo a mi formación académica. También quiero agradecer al Dr. Peter Groffmann y su equipo de trabajo del Institute of Ecosystem Studies (New York, USA), quienes me

enseñaron la técnica del ensayo de reducción de acetileno, y a los Doctores Felipe Hinojosa y José Miguel Fariña por su ayuda en el análisis de datos y ordenación de la tesis.

Agradezco a las siguientes personas por su valiosa ayuda en los trabajos de terreno y laboratorio (en orden alfabético): Sebastián Armesto, Olga Barbosa, Duncan Christie, Fabiola Cortéz, Hernán Díaz, Cristián Frene, Mauricio Fuentes, Rafael Guevara, Andrés Holtz, Paola Jara, Marly López, Viviana Martínez, José Nomque, José Ríos, Carlos Rozas, Cristián Torrealba, Juan Valencia, Armando Vidal y Juan Vidal.

Agradezco a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, CONICYT por haberme otorgado la beca para estudios de Doctorado (años 1997-2000) y el proyecto de financiamiento de tesis doctoral FONDECYT N° 2000022 (años 2000-2002). También doy gracias a los siguientes proyectos e instituciones que contribuyeron directa o indirectamente al financiamiento de esta tesis y de mis estudios de postgrado: Proyecto IAI-CRN-012, A. W. Mellon Foundation, Fondecyt (regular) 1990946, Núcleo Milenio P99-103 FICM y Fondecyt-Fondap Grant 1501-0001 (Center for Advanced Studies in Ecology & Biodiversity). Agradezco a la Corporación Nacional Forestal X Región por haberme autorizado a trabajar en el Parque Nacional Chiloé y contribuir, a través del Guardaparque Don José Ríos, a mi investigación.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Antecedentes bioquímicos y microbiológicos	7
Escala de observación y definición de ecosistema	12
Fijación simbiótica versus no simbiótica	16
Ciclo del nitrógeno a nivel de la detritósfera de un bosque templado	16
OBJETIVO GENERAL	19
ÁREAS DE ESTUDIO	19
Parque Nacional Chiloé	19
Estación Biológica "Senda Darwin"	20
MÉTODO DE ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N ₂	25
I. CARACTERIZACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA MAGNITUD DE LA FIJACIÓN DE N ₂ EN LA DETRITÓSFERA DE UN BOSQUE PRÍSTINO	29
I.1. Hipótesis de trabajo	30
I.2. Objetivos específicos	30
I.3. Materiales y métodos	31
I.3.1. Diseño de muestreo	31

I.3.2. Análisis estadístico	35
I.3.3. Estimación de entrada ecosistémica de N por FNS.....	37
I.4. Resultados	40
I.4.1. Patrón estacional y espacial de la FNS <i>in situ</i>	40
I.4.2. Fijación no-simbiótica de N ₂ en troncos caídos	50
I.4.3. Biomasa de hojarasca	50
I.4.4. Estimación de la entrada ecosistémica de N por FNS	53
I.5. Discusión	56
I.5.1. Patrón estacional de la fijación no-simbiótica de N ₂	56
I.5.2. Fijación de N ₂ en troncos caídos	57
I.5.3. Flujo de N a través de fijación no-simbiótica	57
II. FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N ₂ Y DESCOMPOSICIÓN DEL DETRITUS ORGÁNICO	59
II.1. Hipótesis de trabajo	60
II.2. Objetivo específico	62
II.3. Materiales y métodos	62
II.3.1. Material leñoso	62
II.3.2. Material foliar	63
II.3.3. Determinación de C y N total	64
II.3.4. Análisis estadísticos	66
II.4. Resultados	69
II.4.1. Material leñoso	69
II.4.2. Material foliar	69
II.5. Discusión	82
III. REGULACIÓN DE LA FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N ₂ EN LA DETRITÓSFERA	86
III.1. Hipótesis de trabajo	87
III.2. Objetivos específicos	89
III.3. Materiales y métodos	89

III.3.1. Efecto de variables abióticas	89
III.3.2. Efecto de variables del detritus	93
III.3.3. Análisis estadístico	95
III.4. Resultados	100
III.4.1. Nitrógeno inorgánico disuelto	100
III.4.2. Temperatura e iluminación	101
III.4.3. Contenido hídrico	102
III.4.4. Variabilidad conjunta de variables abióticas y químicas ..	108
III.4.5. Composición biológica	111
III.4.6. Relación entre composición biológica y variables del detritus	115
III.5. Discusión	122
III.5.1. Control a nivel bioquímico: efecto del NID	122
III.5.2. Control ecológico de la FNS: variables abióticas	124
III.5.3. Control de características locales del detritus	125
DISCUSIÓN GENERAL	129
Fijación no-simbiótica de N ₂ en troncos caídos	131
Comparación con otros ecosistemas forestales	132
Vías alternativas de fijación biológica de N ₂	133
Fijación simbiótica de N ₂	134
CONCLUSIONES	140
BIBLIOGRAFÍA	142
APÉNDICE A	A1

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	24
Tabla 2	44
Tabla 3	45
Tabla 4	49
Tabla 5	52
Tabla 6	55
Tabla 7	72
Tabla 8	77
Tabla 9	78
Tabla 10	79
Tabla 11	80
Tabla 12	81
Tabla 13	106
Tabla 14	109
Tabla 15	110
Tabla 16	112
Tabla 17	117
Tabla 18	120
Tabla 19	121
Tabla 20	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detritósfera de un Bosque templado	9
Figura 2. Jerarquía de la FNS en la detritósfera	15
Figura 3. Ciclo del nitrógeno en el bosque templado	18
Figura 4. Mapa de sitio de estudio	22
Figura 5. Imágenes del sitio de estudio	23
Figura 6. Ensayo de reducción de acetileno	27
Figura 7. Imagen de frascos de incubación	28
Figura 8. Mapa de grilla experimental	32
Figura 9. Reducción de acetileno <i>in situ</i> y variables físicas	42
Figura 10. Variabilidad espacial de reducción de acetileno	47
Figura 11. Reducción de acetileno en troncos caídos	51
Figura 12. Estimación de reducción acumulada de acetileno	54
Figura 13. Hipótesis FNS y descomposición	61
Figura 14. Experimento de descomposición	65
Figura 15. Descomposición y FNS en troncos	71
Figura 16. Descomposición y FNS en hojarasca de <i>N. nitida</i>	73
Figura 17. Descomposición y FNS en hojarasca de <i>D. winteri</i>	75
Figura 18. Controles de la FNS	88
Figura 19. Efecto de NID sobre la FNS	103
Figura 20. Relación entre reducción de acetileno y NID	104
Figura 21. Efecto de temperatura sobre la FNS	105
Figura 22. Efecto del contenido hídrico sobre la FNS	107
Figura 23. ACP composición biológica de hojarasca	113
Figura 24. Relación entre la FNS y composición biológica	114

Figura 25. Análisis de redundancia	118
Figura 26. Fijación simbiótica y no-simbiótica	138
Figura 27. Ciclo del N, discusión final	139

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

C	: Carbono
ca.	: aproximadamente
C/N ó C:N	: Relación de masa de Carbono : Nitrógeno.
EBSA	: Estación Biológica "Senda Darwin"
e.g.	: por ejemplo
FNS	: Fijación No-Simbiótica de N ₂
i.e.	: es decir
<i>in situ</i>	: en terreno; medición realizada en el campo, con las condiciones locales
m.s.n.m	: metros sobre el nivel del mar
N	: Nitrógeno
N ₂	: Dinitrógeno
NID	: Nitrógeno Inorgánico Disuelto
RAA	: Reducción Acumulada de Acetileno
TRA	: Tasa de Reducción de Acetileno
vs.	: versus

RESUMEN

La fijación biológica no-simbiótica de dinitrógeno atmosférico (FNS), mediada por bacterias diazótrofias asociadas al detritus orgánico, es un proceso biogeoquímico de ingreso de nitrógeno (N) en ecosistemas de bosques templados. En la capa de hojarasca, también conocida como horizonte orgánico "O" o detritósfera, la tasa de FNS puede estar restringida por variables microclimáticas, y responder a la naturaleza química y biológica del detritus en descomposición. A nivel bioquímico, la FNS es inhibida por el nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en el medio extracelular. Esta forma de N puede ingresar a los ecosistemas terrestres a través de la deposición húmeda (NID en la lluvia y neblina), proceso ligado a la actividad industrial.

En este proyecto se estimó el flujo de entrada de N vía la FNS en la detritósfera de un bosque primario Nordpatagónico de Chiloé, alejado del impacto antropogénico, y se investigaron las causas de su variación. Se enfatizó la relación entre este proceso y la descomposición del detritus orgánico. La actividad diazotrófica se estimó por reducción de acetileno. Se realizaron mediciones *in situ* y experimentos de laboratorio para determinar los efectos de variables abióticas (temperatura, iluminación, contenido hídrico, NID), características químicas (contenido total de C y N) y biológicas (composición de especies y estructuras) del detritus sobre la FNS. Se efectuaron experimentos de descomposición *in situ* (bolsa de malla) de troncos, hojarasca senescente (post abscisión, mayor relación C/N) y hojas verdes (menor C/N) de las especies arbóreas dominantes (*Nothofagus nitida* y *Drimys*

winteri) para comparar la actividad diazotrófica de los substratos a lo largo del tiempo.

La entrada ecosistémica de N por la FNS en la hojarasca se estimó en ca. $0,2 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, cantidad menor que los flujos de deposición húmeda y exportación hidrológica de N. Se observó una fluctuación estacional de la tasa de FNS con máximo estival, determinada por la variación de la temperatura. La FNS aumentó durante el primer año de descomposición de los substratos estudiados, y no difirió entre hojas verdes y senescentes. La temperatura óptima de la tasa de FNS, estimada en el laboratorio fue de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, valor poco frecuente *in situ*. La iluminación no afectó la tasa de FNS. El contenido hídrico afectó positivamente la actividad diazotrófica, pero presentó una baja variación estacional. La adición experimental de NID afectó la tasa de FNS, pero sólo a niveles muy excesivos ($\geq 15 \text{ Kg N ha}^{-1}$). La variación espacial de la FNS estival fue explicada parcialmente por la composición biológica de la hojarasca y su contenido de N total.

La FNS contribuye al balance ecosistémico del N, sin embargo no es suficiente para explicar el nivel de pérdida hidrológica documentado para los bosques Nordpatagónicos. Es necesario estudiar otras vías de ingreso de N (e.g. fijación simbiótica y asociativa) en estos ecosistemas.

ABSTRACT

Non-symbiotic atmospheric dinitrogen fixation (NSF), driven by diazotrophic bacteria associated with organic detritus, is a nitrogen (N) input to temperate forest ecosystems. In the litter layer, also known as "O" horizon or detritosphere, NSF rate can be restricted by microclimatic variables, and respond to chemical and biological nature of the substrate. At the biochemical level, NSF is inhibited by dissolved inorganic nitrogen (DIN) in extracellular media. DIN can also enter terrestrial ecosystems through wet deposition (DIN of rain and cloud water), a process linked to industrial activities.

In this thesis, the N flux through NSF into the detritosphere of an unpolluted old-growth Northpatagonian rainforest was estimated, and the underlying causes of its variability were investigated. The relationship between this process and decomposition of organic detritus was examined. Diazotrophic activity was estimated by acetylene reduction method. Both *in situ* measurements and laboratory experiments assessed the effects of abiotic (temperature, light, water content, DIN), chemical (total C and N content) and biological variables (species and structural components) of detritus on NSF. *In situ* decomposition experiments (litter bag) of wood, senescent leaf litter (post-abscission, higher C/N ratio) and fresh leaves (lower C/N) were done to compare diazotrophic activity.

Ecosystem N input through litter NSF was estimated as ca. 0.2 Kg N ha⁻¹, being lower than both wet deposition and hydrologic N export fluxes. A seasonal fluctuation with a summer maximum of NSF rate was observed, explained by

temperature variation. NSF rate increased during the first year of organic matter decomposition, and did not differ between senescent and green leaves. Laboratory-estimated optimum temperature of NSF was 20 °C, temperature which is infrequently recorded in the field. Illumination did not affect NSF rate. Water content of substrate positively affected diazotrophic activity, but showed low seasonal variability. Experimental DIN addition affected NSF rate, but only at very high levels ($\geq 15 \text{ Kg N ha}^{-1}$). Spatial variation of summer NSF rate was partially explained by litter biological composition and total N content.

NSF N flux contribute to ecosystem N budget, but it does not explain the hydrologic N loss of Northpatagonian forests. Another N input pathways should be studied in these ecosystems (e.g. both associative and symbiotic N_2 fixation).

INTRODUCCIÓN GENERAL

El material orgánico muerto, principalmente de origen vegetal, depositado sobre el suelo de los bosques templados, conocido como horizonte edáfico "O" u "O_i" (Figura 1), es colonizado por una gran diversidad de microorganismos, y constituye un micro hábitat complejo, conocido por algunos autores como "**detritósfera**" (Beare et al. 1995). La importancia de este componente ecosistémico en la dinámica del ciclo de nutrientes de los bosques templados ha sido reconocida en varios trabajos (e.g. Currie 1999), como en el caso de la descomposición y reciclaje de la materia orgánica muerta. Un subconjunto de la diversa microbiota asociada a la detritósfera corresponde a bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Estos microorganismos, conocidos genéricamente como **diazótrofos**, son portadores del complejo enzimático **nitrogenasa**, que cataliza la reducción del dinitrógeno atmosférico (N₂), transformándolo en amoníaco (NH₃). La consecuencia ecológica de esta actividad enzimática es el ingreso de nitrógeno (N) al ecosistema forestal. Este vector de ingreso de "nuevo N" (i.e., distinto del N que circula internamente en el ecosistema) es conocido como **fijación no simbiótica de N₂** (en adelante **FNS**), y puede afectar la disponibilidad de N a nivel ecosistémico tanto en el largo plazo (Vitousek & Hobbie 2000, Vitousek et al. 2002), como a escalas temporales y espaciales más reducidas (O'Connell & Grove 1987, Musacchio et al. 1996, Woitchik et al. 1997). La disponibilidad de N es el factor que más frecuentemente limita el crecimiento de plantas y animales (Chapin et al. 2002,

Galloway & Cowling 2002, Vitousek et al. 2002a), por lo que todo proceso de ingreso ecosistémico de este elemento tiene una enorme importancia ecológica.

La FNS también se conoce como **fijación heterotrófica de N₂** (e.g. Vitousek et al. 2002) debido a que muchos diazótrofos son, al mismo tiempo, bacterias heterótrofas cuya fuente de carbono y energía es el detritus orgánico. Este hecho introduce la idea de que los procesos de FNS y descomposición de la materia orgánica están íntimamente relacionados y probablemente ambos tienen mecanismos de regulación comunes.

Las características y mecanismos regulatorios de la FNS en ecosistemas forestales prístinos han sido escasamente estudiados, en contraste con la gran cantidad de información referente a la fijación simbiótica de N₂ y su relevancia en sistemas naturales y agrícolas (Graham 1998, Vitousek et al. 2002). Por otra parte, la mayor parte de los estudios sobre procesos biogeoquímicos en ecosistemas templados han sido realizados en localidades del Hemisferio Norte sometidas al impacto de los excesivos niveles de nitrato y amonio asociados a la lluvia ácida (Galloway et al. 1994), los que pueden distorsionar los patrones observados, ocultando los mecanismos subyacentes. Sin embargo, los bosques templados costeros del sur de Sudamérica ofrecen una oportunidad única para estudiar procesos biogeoquímicos en condiciones prístinas, con un mínimo nivel de impacto antropogénico (Hedin et al. 1995).

El propósito de esta tesis fue investigar el proceso de FNS en el detritus (especialmente hojarasca) de bosques templados prístinos de la Isla de Chiloé (Chile, X Región). Se estimó la magnitud de la entrada ecosistémica de N por esta vía, y se examinó su variación estacional y espacial a escala intra-rodal y conjuntamente con la descomposición del detritus. Finalmente se estimó el efecto de una serie de variables abióticas y características del detritus sobre la FNS en experimentos de laboratorio y observaciones *in situ*.

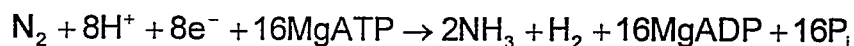
El texto de la tesis se dividió en los siguientes capítulos:

- I. Caracterización y estimación de la magnitud de la fijación no-simbiótica de N₂ en la detritósfera de un bosque prístino.
- II. Fijación no-simbiótica de N₂ y descomposición del detritus orgánico.
- III. Regulación de la fijación no-simbiótica de N₂ en la detritósfera.

Cada capítulo tiene una breve introducción y sus respectivas preguntas, hipótesis y objetivos específicos, además de la metodología específica, los resultados y discusión respectiva. Al final de los capítulos se presenta una discusión general de los resultados de la tesis. En esta introducción general se revisan los aspectos relevantes de la FNS como proceso biológico, bioquímico y ecosistémico y se hacen precisiones sobre la escala espacial y niveles de organización biológica abordados en esta tesis. A continuación se presenta el objetivo general de este trabajo y una breve descripción de los sitios de estudio y de la metodología empleada para estimar la fijación de N₂ en muestras de detritus.

Antecedentes bioquímicos y microbiológicos

Desde el punto de vista bioquímico, la fijación biológica de N₂ es una reacción enzimática **intracelular** representada por la siguiente ecuación (Zuberer 1998):



Ecuación 1

El dinitrógeno atmosférico (N₂) es reducido a amoníaco (NH₃) a expensas de una gran cantidad de energía, estimada en al menos 16 moles de ATP por cada

mol de N_2 fijado (Zuberer 1998, Tate 1995). La reacción es catalizada por el complejo enzimático **nitrogenasa** y el amoníaco producido se transforma en amonio (NH_4^+) el cual es inmediatamente incorporado al metabolismo celular y utilizado en la biosíntesis de compuestos orgánicos nitrogenados relevantes para la vida, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos nitrogenados (Zuberer 1998).



Figura 1

Detritósfera de un bosque templado lluvioso del sur de Chile, es decir, la capa de detritus vegetal depositado sobre el suelo, y sus microorganismos asociados .

El alto costo energético indica la importancia del acceso a una fuente de energía para los diazótrofos. Esta energía puede ser obtenida principalmente a partir del carbono orgánico (heterótrofos) o de la luz (fotoautótrofos).

Por otra parte, estudios genéticos en el diazótrofo de vida libre *Klebsiella pneumoniae* demostraron que la biosíntesis de nitrogenasa es suprimida por la presencia de compuestos nitrogenados en el medio extracelular, principalmente en la forma de amonio (NH_4^+) (Gussin et al. 1986). Zuberer (1998) determinó que la actividad de fijación de N_2 de los diazótrofos de vida libre asociados a la rizósfera de maíz es inhibida a una concentración mínima de $4,2 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ ml}^{-1}$. Este valor puede ser considerado como un umbral mínimo de concentración suficiente para causar la inhibición de la actividad de la nitrogenasa, extrapolable a otros sistemas. En consecuencia, el **nitrógeno inorgánico disuelto (NID = $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$)** presente en la solución acuosa que embebe a la detritósfera, es una importante variable controladora de la fijación biológica de N_2 a nivel bioquímico y celular.

Otro antecedente relevante a nivel bioquímico es que la actividad de la nitrogenasa es **inhibida irreversiblemente por el oxígeno (O_2)** (Mylona et al. 1995, Paul & Clark 1989, Zuberer 1998). No obstante, se han descrito una serie de mecanismos de "protección" frente al O_2 a nivel celular, como por ejemplo el aumento de la tasa respiratoria, la compartimentalización intracelular de la nitrogenasa, protección enzimática "conformacional", etc. que evitan que el proceso de fijación biológica de N_2 sea estrictamente anaeróbico (Zuberer 1998, Tate 1995, Rosswall 1982).

Los diazótrofos constituyen un grupo bacteriano muy diverso, tanto genética como metabólicamente (aerobios, anaerobios facultativos, organotrofos, fototrofos, quimioautótrofos, etc.; Zuberer 1998, Ueda et al. 1995),

por lo que se ha descrito que pueden colonizar casi cualquier sustrato (Zuberer 1998). Con respecto a la tolerancia térmica, la mayoría de los diazótrofos son mesófilos, es decir, no toleran temperaturas extremas, y se ha descrito que la nitrogenasa se mantiene activa entre los 5 y 37 °C (Zuberer 1998). Las bacterias diazotrofas no constituyen un grupo monofilético. Por el contrario, están representadas en todos los grupos filogenéticos de los dominios procarióticos Archaea y Bacteria. Estudios de diversidad microbiana en bosques del Hemisferio Norte, utilizando herramientas moleculares, han detectado que existe una comunidad diazotrófica característica asociada a la capa de hojarasca u horizonte "O" en los ecosistemas forestales, distinta de aquella del suelo mineral subyacente o la de sitios deforestados adyacentes (Widmer et al. 1999, Shaffer et al. 2000).

La actividad diazotrófica también puede verse favorecida por la alta humedad (e.g. Mann & Steinke 1989), la disponibilidad de fósforo (e.g. Eisele et al. 1989) y la presencia de niveles trazas de Molibdeno, Vanadio y Hierro (cofactores de la nitrogenasa, Zuberer 1998, Silvester 1989). Se ha descrito que las condiciones de extrema acidez (pH bajo) pueden inhibir la actividad de fijación de N₂ (Rosswald 1982, Jones & Bangs 1985). En resumen, las condiciones microbiológicas que favorecerían la ocurrencia del proceso de fijación biológica de N₂ son: i) baja disponibilidad de N inorgánico en el medio extracelular; ii) acceso a una fuente de energía (carbono orgánico, luz); iii) protección de la nitrogenasa frente al O₂; iv) condiciones adecuadas de temperatura, humedad y acidez; y v) adecuada disponibilidad de P y micronutrientes. En qué medida estas condiciones se dan en la detritósfera de un bosque templado Sudamericano es una de las preguntas generales que se abordan en esta tesis. Es esperable que se den, al menos en algún periodo del ciclo anual y en algún lugar del espacio, donde la cantidad y calidad del detritus sea adecuada para albergar diazótrofos activos.

Escala de observación y definición de ecosistema

En su calidad de proceso bacteriano, la FNS puede ser estudiada en varias escalas espaciales, considerando distintos niveles de organización biológica y enfatizando el flujo de dinitrógeno atmosférico hacia la biomasa microbiana, catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa (Figura 2). A nivel celular, un conjunto de unidades de complejo enzimático reducen N_2 en el interior celular. En condiciones controladas de laboratorio se pueden obtener cultivos puros de una especie particular de diazótrofo logrando determinar la actividad enzimática como gramos de N_2 fijados por unidad de masa de bacteria. En cambio, en la detritósfera de un bosque templado, poblaciones de distintas especies de bacterias diazotrofas coexisten en el detritus junto a otros micro, meso y macroorganismos (Coleman & Crossley 1996), y su actividad enzimática total produce un flujo de N_2 por unidad de masa de detritus (incluyendo sus organismos asociados) cuya magnitud dependerá de las condiciones abióticas, de las características del detritus y de la biomasa total de la comunidad diazotrófica (i.e., cantidad de enzima presente). Finalmente, la actividad diazotrófica total asociada a toda la capa de hojarasca existente en un área de bosque determinada dará lugar a un flujo de N a nivel ecosistémico. Estos últimos, son los flujos de interés ya que la detritósfera es el componente funcional estudiado en esta tesis (Figura 2).

En el caso de los bosques lluviosos, la definición operativa de ecosistema más utilizada, desde el punto de vista biogeoquímico, se basa en el criterio de microcuenca hidrográfica, según el cual el límite del ecosistema forestal está definido topográficamente por el área de captación de lluvias drenada por un curso de agua (Likens et al. 1977, Aber & Melillo 1991). De esta manera, en el interior de esta área se distinguen todos los componentes relevantes del sistema y los respectivos flujos de materiales que los comunican. En general, los principales componentes son la biomasa vegetal y el suelo,

dentro del cual se encuentra el reservorio de nutrientes disponibles y nutrientes inmovilizados en la materia orgánica muerta y sus microorganismos asociados. Entre estos componentes y el exterior ocurren los flujos de entrada y salida que determinan las pérdidas y aportes de nutrientes en el ecosistema.

En el caso del nitrógeno, las principales entradas ecosistémicas corresponden a los flujos de deposición húmeda y seca de N, y la fijación biológica de N_2 (Likens et al. 1977). El principal flujo de pérdida ecosistémica de N corresponde a la exportación hidrológica de este elemento a través del estero de drenaje (Likens et al. 1977), aunque también existen emisiones gaseosas de compuestos nitrogenados y dinitrógeno. Dado que esta tesis está centrada en un componente ecosistémico en particular, que es **el detritus orgánico superficial del suelo, o detritósfera, u horizonte edáfico "O"**, en la definición de modelo ecosistémico utilizada se enfatiza este componente (Figura 3). Desde el punto de vista estadístico, el universo muestral corresponde a toda la capa de detritus orgánico depositada sobre el suelo presente en un área representativa de bosque templado. Las unidades muestrales son, en consecuencia, pequeñas porciones de este material colectadas al azar o regularmente en puntos o áreas del espacio. El flujo ecosistémico de entrada de N a través de la actividad de fijación biológica de N_2 por parte de diazótrofos de vida libre asociados a la detritósfera ingresa directamente a este componente (Figura 3).

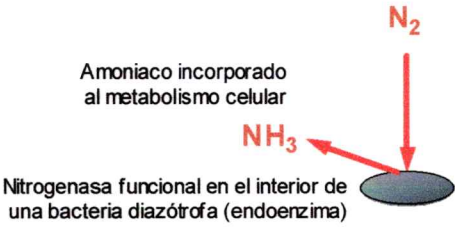
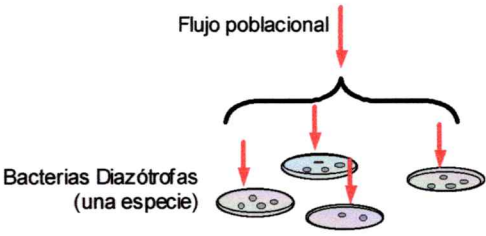
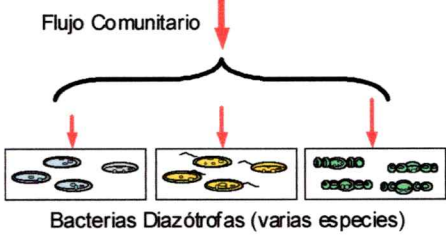
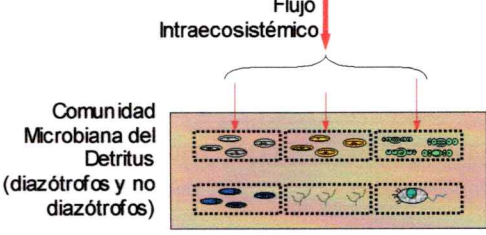
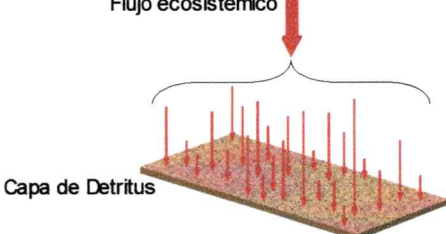
Nivel	Unidades Típicas de Flujo de Nitrógeno	Situación espacial del proceso y sus componentes
Enzimático/ Intracelular	$\frac{\text{mol N}}{(\text{g Enzima}) \cdot \text{s}}$	<p style="text-align: center;">  </p>
Celular/Poblacional	$\frac{\text{mol N}}{(\text{g Bacterias}) \cdot \text{s}}$	<p style="text-align: center;">  </p>
Comunidad Diazotrófica	$\frac{\text{mol N}}{(\text{g Diazótrofos}) \cdot \text{s}}$	<p style="text-align: center;">  </p>
Detritósfera (Intraecosistémico)*	$\frac{\text{g N}}{(\text{g Detritus}) \cdot \text{d}}$	<p style="text-align: center;">  </p>
Detritósfera (Ecosistémico)*	$\frac{\text{Kg N}}{\text{ha} \cdot \text{año}}$	<p style="text-align: center;">  </p>

Figura 2
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 2

Jerarquía del proceso de fijación biológica de N_2 en la detritósfera de un bosque templado, enfatizando la situación de las bacterias diazótrofas portadoras del complejo enzimático nitrogenasa que cataliza el proceso en todos los niveles. Las flechas rojas simbolizan el flujo de N debido a la fijación biológica de N_2 . Los niveles estudiados en esta tesis se indican con asterisco (*).

Fijación simbiótica versus no simbiótica

Esta tesis se centró en el estudio del fijación no-simbiótica de N_2 en la detritósfera, debido a que en este componente (la detritósfera) los diazótrofos no se asocian simbióticamente con otros organismos (pero ver discusión general). Fuera de este componente pueden existir asociaciones simbióticas, pero no fueron estudiadas en esta tesis. En la sección final de este documento se incluye una discusión sobre la fijación simbiótica y su potencial importancia en los bosques templados y otros ecosistemas.

Ciclo del nitrógeno a nivel de la detritósfera de un bosque templado

El N incorporado a través de la fijación no-simbiótica de N_2 es "nuevo", es decir, es distinto del que circula internamente en el ecosistema. Este N es ingresado directamente a la detritósfera como N orgánico en la biomasa de diazótrofos. Eventualmente este N orgánico es transformado por acción microbiana en N inorgánico, principalmente en la forma de nitrato y amonio (mineralización), pudiendo ser reutilizado por microorganismos y plantas (ciclo interno, Figura 3). Una fracción del N, tanto orgánico como inorgánico es transportada por arrastre hidrológico hacia los horizontes minerales del suelo, subyacentes a la capa de hojarasca, en donde eventualmente es reabsorbida por la vegetación y los microorganismos, u exportada a través del estero de drenaje (Figura 3). En el Hemisferio Norte, se ha documentado que la exportación hidrológica de N está dominada por N inorgánico, y es mayor que la observada en los bosques templados del sur de Sudamérica, en donde existe una mayor proporción de N orgánico (Perakis & Hedin 2002).

Otro vector importante de ingreso de N al ecosistema forestal es la deposición húmeda de N, esto es, la entrada de N fijado disuelto o en

suspensión en la lluvia o neblina. Según Galloway et al. (1994 y 1996), Galloway & Cowling (2003) y Vitousek et al. (1997), la distribución y naturaleza química de la deposición húmeda de N es altamente heterogénea a lo largo del globo, debido a la contribución desigual de las emisiones industriales de óxidos de nitrógeno. Actualmente, los bosques templados del sur de Sudamérica reciben un nivel extremadamente bajo de NID a través de deposición húmeda, comparado con lo que sucede en bastas áreas de bosques templados del Hemisferio Norte, en donde la "lluvia ácida" rica en N ha alterado dramáticamente la circulación natural de N (Aber et al. 1989, Durka et al. 1994). Por ejemplo, la concentración promedio de NID en el agua de neblina captada en el Parque Nacional Chiloé, es de $10 \mu\text{mol l}^{-1}$, un orden de magnitud menor que aquellas registradas en sitios comparables del Hemisferio Norte (Weathers et al. 2000). La deposición húmeda de NID en los bosques costeros de Chiloé ha sido estimada en ca. $0.8 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Hedin et al. datos no publicados). Sumando el aporte de N orgánico disuelto, la entrada ecosistémica total de N vía deposición húmeda es de ca. $2 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Hedin et al. datos no publicados). La influencia de la química de la precipitación sobre la detritósfera se ejerce principalmente a través del flujo fustal y escurrimiento a través del dosel. Aunque la composición química del agua de lluvia y neblina puede ser afectada durante su paso por el dosel del bosque (Serrano 1996), ambos flujos pueden alterar el reservorio de NID contenido en la solución que embebe la detritósfera (Figura 3, Currie et al. 1999). Debido al efecto del NID sobre la fijación biológica de N_2 ya discutido en la sección I.1, la deposición húmeda de N puede afectar enormemente a este proceso ecosistémico.

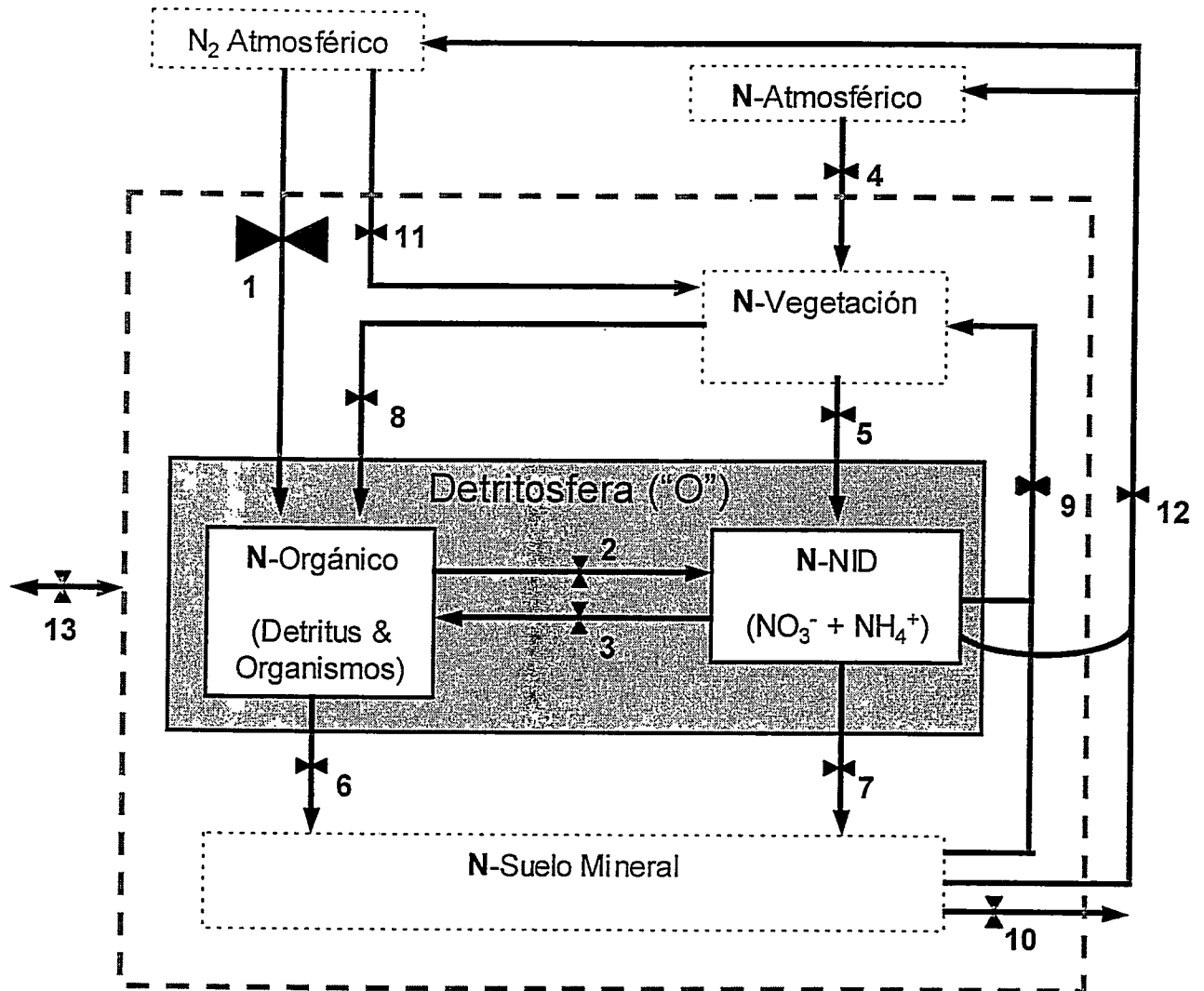


Figura 3

Diagrama conceptual del ciclo del N en un bosque templado lluvioso, enfatizando los procesos y compartimentos asociados al horizonte edáfico "O" (detritósfera). La línea punteada indica el límite del ecosistema. Flujos: 1. Fijación no-simbiótica de N₂ (flujo de interés de esta tesis); 2. Mineralización bruta de N; 3. Inmovilización bruta de N; 4. Deposición húmeda de N; 5. Escurrimiento fustal y a través del dosel; 6. Lavado de N orgánico; 7. Lavado de N inorgánico; 8. Caída de hojarasca; 9. Absorción; 10. Exportación hidrológica; 11. Fijación simbiótica de N₂; 12. Exportación gaseosa de N (desnitrificación, nitrificación y volatilización de NH₃) y 13. Otros procesos de entrada y salida (e.g. inmigración animal).

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el proceso biogeoquímico de fijación no-simbiótica de N_2 en la detritósfera de un bosque templado sometido a un mínimo impacto antropogénico y analizar cómo se vincula este proceso con la descomposición del detritus y el balance del N en el ecosistema.

ÁREAS DE ESTUDIO

La mayoría de las observaciones *in situ* descritas en esta tesis fueron realizadas en un bosque primario del Parque Nacional Chiloé, sector Abato (Chile, X Región). El material utilizado en algunos experimentos de laboratorio también fue colectado en este sitio. El experimento de descomposición *in situ* de hojarasca (Capítulo II, sección II.3.2) fue instalado en un bosque primario ubicado en la Estación Biológica "Senda Darwin". En este bosque también se colectó material para muchos de los experimentos de laboratorio realizados.

Parque Nacional Chiloé.

Se trabajó en un área de ca. 0,4 ha dentro de una microcuenca cubierta de bosque templado montano, localizada a una altitud de ca. 600 m.s.n.m. en la Cordillera de la Costa de la Isla de Chiloé, llamada "Piuchué", "Pichihué" o "Piuchen"). Esta área se encuentra dentro del Parque Nacional de Chiloé, administrado por CONAF X Región (Tabla 1, Figuras 5 y 6). El clima es templado frío con una fuerte influencia oceánica (Di Castri & Hajek, 1976). La precipitación anual supera los 5.000 mm y la temperatura media anual es de 6°C (Perakis & Hedin 2002). La vegetación corresponde a un bosque primario siempreverde de tipo Nordpatagónico (Armesto et al. 1995, Veblen et al. 1995) con el dosel dominado por las especies arbóreas siempreverdes *Nothofagus*

nitida (Fagaceae), *Drimys winteri* (Winteraceae), *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) y *Laureliopsis philippiana* (Monimiaceae). El sotobosque está dominado por *Chusquea* sp. (Gramineae), *Myrceugenia chrysocarpa* (Myrtaceae), *Desfontainia spinosa* (Desfontainiaceae) y *Tepualia stipularis* (Myrtaceae). El suelo superficial (0-10 cm) tiene un alto contenido de carbono orgánico (> 50%) y una relación C/N de 33.4 (Pérez et al. 1998, 2003). El espesor promedio de la capa de hojarasca se estimó en $1,8 \pm 0,1$ cm (\pm EE, n = 186, Christie & Armesto 2003). La tasa promedio anual de caída de hojarasca ha sido estimada en $3,33 \pm 0,53$ Mg ha⁻¹ (\pm EE, n = 3 años; Pérez et al. 2003), con el máximo de caída en otoño (Marzo-Junio). El bosque también presenta una alta abundancia de residuos leñosos gruesos (> 5 cm diámetro), cuya biomasa ha sido estimada en 65 Mg ha⁻¹ (Carmona et al. 2002). Los bosques del Parque Nacional Chiloé pueden considerarse como de antiguo crecimiento (old-growth) debido al bajo nivel de perturbación antrópica y al hecho de que toda la zona de la Cordillera de Piuchué ha permanecido relativamente estable climática y florísticamente durante el Holoceno (Hedin et al. 1995, Villagrán 1990), lo que ha permitido un desarrollo ecosistémico continuo durante los últimos 10.000 años. Para descripciones más detalladas de este sitio ver Pérez et al. (1998, bosque "mixed-angiosperm *Nothofagus*"; 2003, bosque "MBF"), Carmona et al. (2002, sitios O3 y O4), Perakis & Hedin (2001), Perakis & Hedin (2002, bosque MF) y Vann et al. (2002, bosque MS). El acceso a este sitio es extremadamente difícil y requiere de vehículos de doble tracción y caballos como medio de transporte. El lugar cuenta con un refugio rústico en donde fue posible operar con los aspectos básicos del proyecto.

Estación Biológica "Senda Darwin".

Se trata de un bosque Nordpatagónico de características florísticas similares al anterior (Parque Nacional Chiloé), ubicado en la Estación Biológica Senda Darwin (EBSA) (Tabla 1, Figura 4), al norte de la ciudad de Ancud. El

paisaje consiste en lomajes suaves de hasta 100 metros de altitud cubierto por un mosaico de bosques primarios y secundarios fragmentados por praderas y campos agrícolas de pequeña magnitud. El clima es templado húmedo con una fuerte influencia oceánica (Di Castri & Hajek, 1976). Registros meteorológicos (4 años) en la estación Biológica Senda Darwin indican una precipitación anual de 2.090 mm y una temperatura media anual de 12° C. Las temperaturas máxima de verano (Enero) es de 16 °C y mínima de invierno (Julio-Agosto) es de 5 °C (Aravena et al. 2002). Las precipitaciones ocurren todo el año, pero el 64% se concentra entre Abril a Septiembre. El dosel arbóreo está dominado por *N. nitida*, *D. winteri*, *Saxegotheaea conspicua* (Podocarpaceae), *L. philippiana*, *P. nubigena* y *Weinmannia trichosperma* (Cunoniaceae). En el sotobosque se observa una gran abundancia de *Chusquea* sp. El suelo presenta un pH de $3,9 \pm 0,4$ (\pm EE, n = 6), un contenido total de Carbono de 39 ± 9 % peso seco (\pm EE, n = 6), una relación C/N de 29 ± 4 (\pm EE, n = 6) y una densidad aparente de $0,2 \pm 0,04$ g secos cm^{-3} (\pm EE, n = 6) (Aravena et al. 2002). Para una descripción más detallada de este sitio y sus alrededores consultar Aravena et al. 2002 (sitio OG) y Christie & Armesto 2003 (sitio OG1).

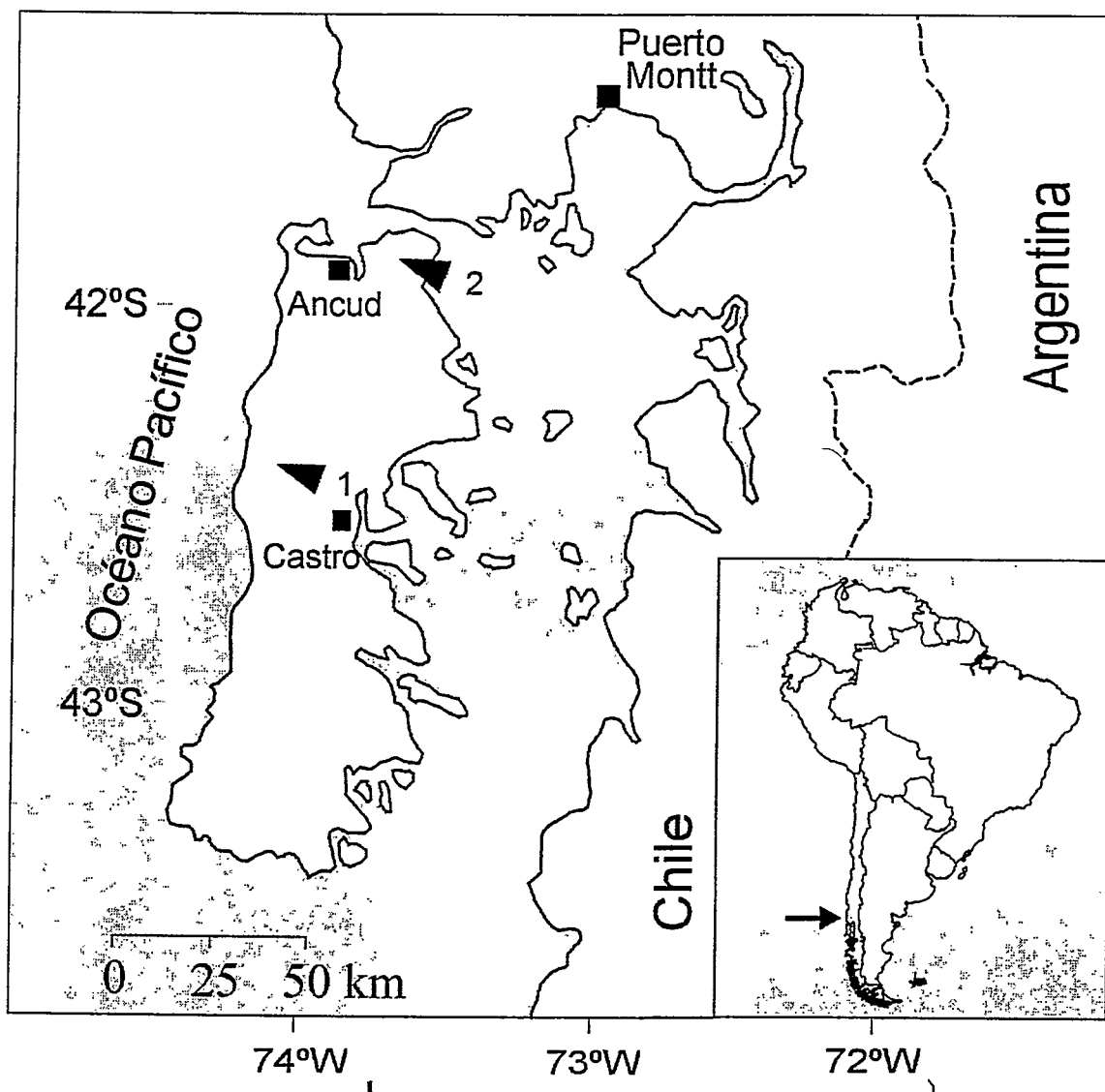


Figura 4

Ubicación de los sitios de estudio. Flecha 1: Bosque NordPatagónico montano del Parque Nacional Chiloé (sector Abtao). Flecha 2: Bosque NordPatagónico de tierras bajas de la Estación Biológica "Senda Darwin". Los cuadrados negros indican la ubicación de los centros urbanos de Castro, Ancud y Puerto Montt.

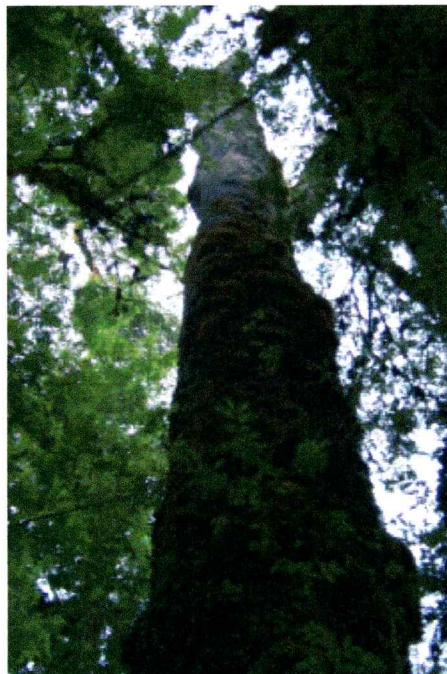


Figura 5

Sitio de Estudio: Bosque NordPatagónico de la Cordillera de Piuchué, Parque Nacional Chiloé, sector Abtao.

Tabla 1.- Características de los sitios de estudio.

Propiedad	Parque Nacional Chiloé (Abato)	Estación Biológica "Senda Darwin"
Altitud (m.s.n.m)	~ 600	~ 100
Latitud / Longitud	42° 21' S, 74° 06' W	41° 53' S, 73° 40' W
Temperatura media anual (°C)	6 ^a	12 ^c
Precipitación media (mm)	5.840	2.090 ^c
Edad media árboles adultos (años)	~ 200 ^b	~ 200 ^c
Area basal total (m ² ha ⁻¹)	69 ^b	71 ^c
Pendiente media (°)	16	~ 0

a Perakis & Hedin 2002

b Carmona et al. 2002

c Aravena et al. 2002

METODO DE ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N₂

La tasa de fijación biológica de N₂ se estimó indirectamente mediante el **método de reducción de acetileno**, siguiendo el procedimiento general descrito por Hardy et al. (1968), con algunas modificaciones. El método se basa en el hecho de que el complejo enzimático nitrogenasa cataliza la reducción de acetileno (C₂H₂) cuando este gas orgánico está presente en exceso en la atmósfera. El producto de esta reducción es el gas etileno (C₂H₄), que puede ser cuantificado por cromatografía de gases. El procedimiento general empleado se ilustra en las Figuras 6 y 7. Los frascos con las muestras de interés en su interior se incuban en el campo (*in situ*) o en condiciones controladas de laboratorio durante 48 horas. Ensayos previos demostraron que este tiempo es suficiente para lograr una producción detectable de etileno, observándose un comportamiento lineal de la curva de producción de etileno versus tiempo. Para determinar la concentración de etileno de las muestras de atmósfera interna de los frascos se utilizaron mezclas de concentración conocida con estándar de C₂H₄ en N₂ 100 ppm (Scotty speciality gases) y un cromatógrafo de gases provisto de un detector de ionización de llama (Shimadzu GC-8AIF) y una columna de acero rellena con Porapak N (Supelco®, 1m x 1/4"ss, 80/100 mesh). El cromatógrafo utilizó N₂ como gas transportador (carrier) y la temperatura de la columna y detector se fijó en 50°C (McNair 1981). Para calcular la **tasa de reducción de acetileno** (TRA) de la muestra de interés, se estima la pendiente de la curva de concentración de etileno en función del tiempo de incubación y se determina la masa seca de la muestra incubada secándola en una estufa a 70 °C por 72 horas. En el caso de los ensayos *in situ*, las muestras se guardan en bolsas plásticas herméticas y se mantienen en frío (4 °C) hasta su secado. La TRA se expresa como nanomoles de etileno producidos por gramo seco de material y por día de incubación y (nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹). Para controlar la posible producción de etileno

por procesos ajenos a la reducción de acetileno por nitrogenasa (producción endógena de etileno), en todos los experimentos se incluyeron muestras incubadas en aire puro sin acetileno. En ninguna de esas muestras se detectó producción de etileno.

Dado que la tasa de reducción de acetileno es un estimador indirecto de la tasa de fijación biológica de N_2 , para obtener esta última se aplica una razón teórica de conversión molar de $C_2H_2 : N_2$ fijado de 3:1 (Zuberer 1998), aunque diversos estudios han determinado que esta razón puede variar, dependiendo del substrato (Myrold et al. 1999). Sin embargo, el método de reducción de acetileno es altamente sensible y adecuado para comparar la actividad diazotrófica de muestras relativamente pequeñas y espacialmente acotadas (Myrold et al. 1999).

Esta metodología se empleó en todos los experimentos de laboratorio y observaciones de terreno realizadas en esta tesis. Los procedimientos experimentales específicos se detallan en cada capítulo.

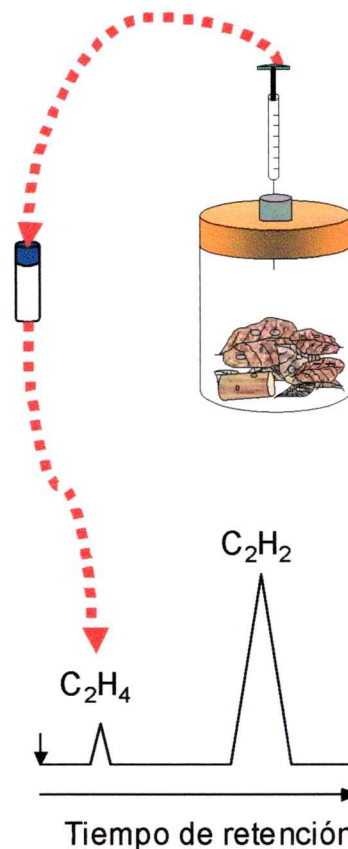
Ensayo de Reducción de Acetileno (Hardy et al. 1968)

I. Incubación

La muestra se incuba en un frasco hermético de 1 Litro con una mezcla $C_2H_2/Aire$ (10% v/v) durante 48 h *in situ* o en el laboratorio. Con una jeringa se retiran muestras de aire cada 24 h, las que son guardadas en tubos herméticos y estériles.

II. Análisis Cromatográfico

Las muestras de aire se analizan en un cromatógrafo de gases para determinar la concentración de etileno ($nmol C_2H_4 ml^{-1}$). Los gases de la mezcla se separan dentro de una columna de material poroso, siendo detectados en distintos momentos (tiempos de retención) lo cual produce un cromatograma con distintos picos, cuya área bajo la curva es proporcional a la concentración del gas respectivo.



II. Tasa de Reducción de Acetileno (TRA)

La pendiente de la curva de producción de etileno en función del tiempo de incubación y el peso seco de la muestra incubada se utilizan para calcular la tasa de reducción de acetileno expresada en $nmol C_2H_4 \cdot g \text{ peso seco}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$.

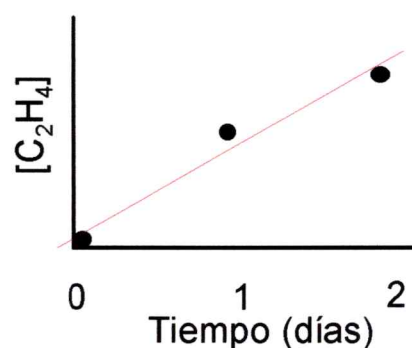


Figura 6

Protocolo del ensayo de reducción de acetileno para estimar fijación biológica de N_2 .



Figura 7

Frascos herméticos de un litro de capacidad provistos de una tapa con tapón de goma para las incubaciones del ensayo de reducción de acetileno. Los tapones de goma están conectados a una válvula a través de una aguja hipodérmica. Estas válvulas permiten el muestreo de gases del interior del frasco.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA MAGNITUD DE LA FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N₂ EN LA DETRITÓSFERA DE UN BOSQUE PRÍSTINO

Los antecedentes sobre el ciclo del N en el sitio de estudio del parque Nacional Chiloé indican que los bosques templados lluviosos prístinos del sur de Sudamérica están limitados por N, y la pérdida hidrológica de este elemento es mayor que la entrada por deposición atmosférica (Hedin et al. datos no publicados, Hedin et al. 1995, Perakis & Hedin 2002, Vann et al. 2002, Weathers et al. 2000). Bajo el supuesto de estado estacionario, propio de ecosistemas antiguos, se puede afirmar que existe un desbalance de N. Este desbalance puede potencialmente ser explicado por fijación biológica de N₂, y en particular por FNS en la detritósfera, dada la acumulación de este componente en ecosistemas templados antiguos. La FNS en su calidad de proceso microbiano puede depender de las variaciones de luminosidad, temperatura y humedad en la detritósfera.

En este capítulo se caracterizó la FNS en el sitio del Parque Nacional Chiloé, describiendo su variación estacional y espacial y estimando la magnitud de la entrada ecosistémica de N a través de este proceso. Se enfatizó el componente de la hojarasca, sin embargo

también se consideró a los troncos caídos. Finalmente se evaluó la importancia de este proceso en el balance del N en el ecosistema estudiado.

I.1. Hipótesis de trabajo

Debido al bajo aporte atmosférico de N fijado (Galloway et al. 1996, Hedin et al. 1995), el alto nivel de pérdida hidrológica de N (Perakis & Hedin 2002), y la alta biomasa de detritus orgánico documentada en bosques templados del sur de Chile alejados de fuentes de contaminación, la entrada ecosistémica de N a través del proceso de fijación no-simbiótica de N_2 contribuye al balance interno del ciclo del N en estos ecosistemas, siendo su magnitud comparable a la deposición húmeda de NID.

I.2. Objetivos específicos

Objetivo 1

Caracterizar la variación estacional y espacial (a escala intra-rodal) de la actividad de fijación no-simbiótica de N_2 en la detritósfera de un bosque primario Nordpatagónico de la isla de Chiloé, Chile.

Objetivo 2

Estimar la correlación entre FNS y la iluminación, temperatura y contenido hídrico de la hojarasca a lo largo del tiempo.

Objetivo 3

Estimar la biomasa de la hojarasca presente en el sitio de estudio.

Objetivo 4

Estimar la magnitud de la entrada ecosistémica anual de N a través de la fijación no-simbiótica de N_2 , y comparar dicho resultado en el contexto del conocimiento del ciclo del N en bosques templados sometidos a la contaminación atmosférica (deposición industrial de N).

I.3. Materiales y métodos

I.3.1. Diseño de muestreo

Grilla experimental

Para caracterizar la variación estacional y espacial de la FNS en hojarasca del bosque Nordpatagónico del Parque Nacional de Chiloé (Figura 4) se realizaron mediciones cada dos a tres meses de la actividad de reducción de acetileno *in situ* dentro de un área representativa del bosque Nordpatagónico estudiado. En ella se instaló una grilla experimental de 100 x 40 m equivalente a 0,4 ha, con 55 puntos de incubación ubicados regularmente cada 10 m a lo largo de cinco transectos paralelos de 100 m de longitud separados entre sí por 10 m. Los transectos fueron trazados con brújula siguiendo la inclinación del terreno con rumbo 212° (ca. Sur-Oeste). Cada punto fue marcado con una estaca de PVC y se midió la inclinación existente entre estacas sucesivas, obteniendo a partir de ellas la altura relativa de cada estaca con respecto al nivel más bajo. En la Figura 8 se muestra un mapa de la grilla experimental, con la posición de cada estaca proyectada en el plano horizontal (xy) y con la microtopografía del área. El área muestreada fue lo suficientemente grande como para abarcar zonas de claros y zonas bajo dosel, características de los bosques antiguos (Perry 1994, Veblen et al. 1995) y lo suficientemente pequeña como para permitir una rápida instalación de los frascos de incubación.

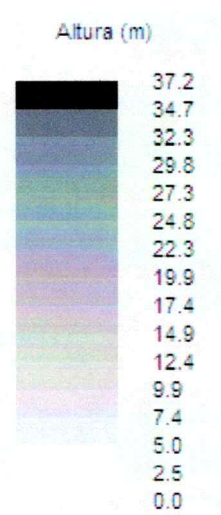
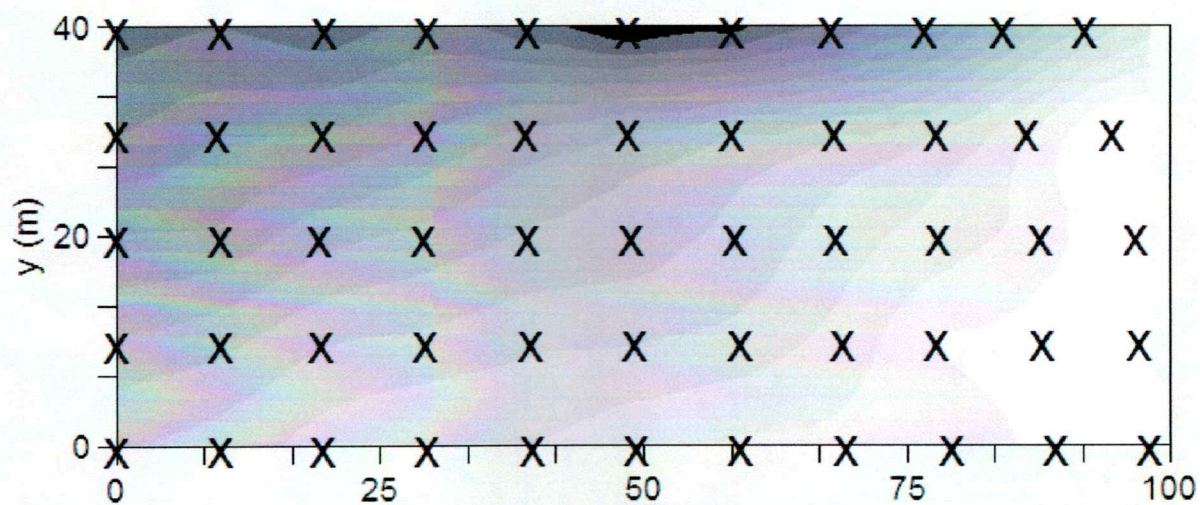


Figura 8

Mapa de la grilla experimental instalada en una ladera del bosque NordPatagónico del Parque Nacional Chiloé (sector Abtao). Las cruces (X) indican la ubicación de los puntos de muestreo, proyectados en el plano xy. Se indica las curvas de nivel de altura relativa (escala de grises) y la orientación de la grilla (mapa realizado en GS + mediante kriging de los datos de altura relativa de los puntos de muestreo).

Ensayos de reducción de acetileno *in situ*

Los ensayos fueron realizados según lo descrito en la Introducción general. Se colectaron muestras de hojarasca de ca. 28 gramos secos dentro de un radio de ca. 1 m en torno a cada punto de la grilla, utilizando guantes de goma. El material colectado correspondió a todo el horizonte "O" (ca. 2 cm de profundidad; restos vegetales reconocibles) y fue introducido en los frascos de incubación donde se sometió al ensayo de reducción de acetileno *in situ*.

Se realizaron nueve ensayos entre Mayo del 2000 y Febrero del 2002. En Enero del 2003 se efectuó una última medición adicional. El número de muestras incubadas varió entre 5 y 55 (grilla completa), concentrando el mayor esfuerzo de muestreo en los periodos estivales (Noviembre-Marzo), en donde se observó la mayor actividad. De acuerdo con el objetivo específico 2, en cada fecha y punto de muestreo se registraron además las siguientes variables abióticas: temperatura superficial del suelo (termómetro digital, Extech Instruments 421501 Type K), iluminación (luxómetro digital, Sper Scientific, 840020 Light Meter) y contenido hídrico del substrato. Esta última variable se estimó determinando el peso fresco y seco de la muestra (gravimetría) y se expresó como gramos de agua por gramo seco de material. En el caso de la temperatura e iluminación se promediaron las lecturas tomadas a las 24 y 48 horas de incubación.

Estimación de biomasa de hojarasca

La biomasa de hojarasca presente en el sitio de estudio es un valor necesario para estimar el flujo de entrada de N por fijación no-simbiótica. Esta cantidad se estimó en Febrero 2002, colectando muestras de hojarasca (horizonte "O") al azar con un cuadrante metálico de 20 x 20 cm y determinando su masa seca (Harmon et al. 1999). La colecta fue realizada en cada uno de los 55 puntos de la grilla experimental, ubicando el cuadrante a una distancia de tres metros de cada punto, en una dirección escogida al azar. Este muestreo

fue estrictamente aleatorio, para obtener una estimación no sesgada de la cantidad de hojarasca presente en el sitio de estudio.

Las muestras fueron guardadas en bolsas herméticas de plástico y transportadas al laboratorio en donde se las sometió a un ensayo de reducción de acetileno en condiciones de laboratorio (20 °C y oscuridad) antes de secarlas (70 °C, 72 h) para determinar su masa seca y otras variables del detritus descritas más adelante (Capítulo III). Este ensayo sirvió como referencia para la comparación con las tasas de reducción de acetileno (TRA) *in situ*.

Ensayo de reducción de acetileno en troncos caídos

Si bien esta tesis se centró principalmente en la hojarasca, también se estimó la fijación no-simbiótica de N_2 *in situ* en troncos caídos de diámetro mayor a 5 cm, llamados desechos leñosos gruesos (Harmon et al. 1986). Los ensayos se realizaron en Noviembre del 2000 y Febrero del 2001. Se colectaron trozos de troncos caídos en descomposición presentes dentro del área de la grilla experimental. Cada trozo fue colectado con serrucho de mano, cincel y martillo de la superficie de los troncos, hasta una profundidad máxima de 10 cm. De acuerdo a lo observado por Hendrickson (1988), la capa periférica de 10 cm de profundidad de los troncos caídos posee la mayor actividad de fijación no-simbiótica de N_2 . En el ensayo de Febrero del 2001, los troncos caídos muestreados fueron clasificados según su estado o grado de descomposición en cinco clases cualitativas descritas por Maser et al. (1988): Clases I-II = Troncos recientemente depositados sobre el suelo, descomposición reciente; Clase III = descomposición intermedia; y Clases IV-V = descomposición avanzada. Se colectaron siete muestras de cada clase las que fueron incubadas en siete puntos consecutivos de uno de los transectos de la grilla experimental. En cada punto se incubaron muestras de las cinco clases de descomposición, según el protocolo de reducción de acetileno.

1.3.2. Análisis estadístico

Análisis temporal y espacial

Se comparó el promedio de las tasas reducción de acetileno de todas las fechas de muestreo mediante análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn (apropiada para tamaños muestrales desiguales entre grupos, Zar 1996) utilizando el programa SigmaStat (versión 2.0, Jandel Corporation). Para visualizar la tendencia estacional se graficó la TRA promedio de cada fecha en función del tiempo. Para describir la fluctuación estacional resultante, se ajustó un modelo de regresión sinusoidal (función periódica) a los datos sin promediar, según la siguiente ecuación:

$$TRA = TRA_0 + A \cdot \text{seno}\left(\frac{2\pi}{T} \cdot t + \delta\right)$$

Ecuación 2

Donde TRA_0 corresponde a un umbral mínimo de TRA, A es la amplitud de las oscilaciones, T es el periodo de una oscilación completa (ciclo anual) que fue fijado en 365 días, δ es un parámetro de desfase temporal y t es el tiempo en días. La estimación inicial de los parámetros TRA_0 , A y δ y el respectivo análisis de varianza fue realizado en el programa SigmaPlot (versión 2000 demo, SPSS Inc.). Posteriormente se obtuvieron estimaciones de bootstrap y errores estándar de los parámetros, repitiendo 5000 veces la estimación, por método de mínimos cuadrados, y utilizando un conjunto de datos aleatorizados (remuestreo con reposición de pares de valores de TRA versus tiempo) en cada repetición. Este procedimiento fue realizado en el programa PopTools (versión 2.5, Hood 2000).

Además se exploró la existencia de una tendencia de largo plazo de los datos de TRA *in situ* vs. tiempo, realizando un ajuste de regresión lineal de los datos sin promediar, y aplicando una prueba de aleatorización (Manly 1997)

para determinar la significancia estadística de la pendiente. Esta prueba esta basada en la repetida reasignación estocástica de las TRA en las fechas de muestreo (2000 iteraciones), el recálculo de la pendiente y la comparación del valor observado con la distribución nula (esperada por azar) resultante de las reasignaciones. Posteriormente se efectuó el ajuste sinusoidal en los residuales de la regresión, para re-evaluar la fluctuación estacional de la TRA *in situ*. En este caso los valores iniciales de los parámetros fueron los mismos del ajuste original, salvo TRA₀, que fue igual a cero.

Se realizó una descripción estadística básica de la TRA de los ensayos de Enero 2001, Diciembre 2001 y Febrero 2002 (máximo esfuerzo de muestreo) y se evaluó la autocorrelación espacial de los datos de la TRA *in situ* mediante la prueba de Mantel (Manly 1997, Fortin & Gurevitch 1993). Para esta prueba se calcularon la matriz de distancias Euclidianas (Manly 1994), D_{xy} , y la matriz de diferencias de las TRA, T, entre pares de puntos de la grilla experimental (Figura 8). Para esta última matriz, se utilizó la siguiente expresión:

$$t_{ij} = |TRA_i - TRA_j|$$

Ecuación 3

donde TRA_i y TRA_j son las tasas de reducción de acetileno *in situ* de las muestras de hojarasca correspondientes a los puntos i y j, respectivamente (la ecuación 3 es equivalente al caso univariado de la distancia Euclidea). Luego se calculó la correlación entre la matrices D_{xy} y T (correlación de Mantel). La significancia de la asociación se evaluó realizando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz T, y comparando la correlación observada con la distribución nula resultante (Manly 1997). La prueba de Mantel se realizó con el programa PopTools v (Hood 2000). Se realizaron otros análisis espaciales adicionales que se presentan en el Apéndice A.

Correlación entre TRA y variables abióticas

Se evaluó la asociación entre las variables abióticas y la actividad de fijación de N_2 calculando los coeficientes de correlación no paramétrica de **Spearman** (Zar 1996) entre el promedio de TRA de cada fecha de muestreo y los respectivos promedios de temperatura superficial del suelo, iluminación y contenido hídrico del substrato ($n = 10$). La significancia de la correlación fue evaluada mediante una prueba de aleatorización (Manly 1997), según el procedimiento descrito a continuación. Cada coeficiente fue recalculado 999 veces, realizando en cada repetición una reasignaron aleatoria de los valores de TRA en las distintas fechas de muestreo (remuestreo sin reposición). Con ello se obtuvo una distribución nula o esperada por azar de pseudovalores de cada coeficiente, incluyendo al valor original (1000 pseudovalores). Después se comparó cada valor original u observado con su respectiva distribución nula. El valor de probabilidad de dos colas correspondiente se calculó como el número de pseudovalores cuyo valor absoluto fue mayor o igual al valor absoluto del valor original, dividido por el numero total de iteraciones (1000). Las probabilidades calculadas corresponden a pruebas de significancia de dos colas, y se consideraron como significativos aquellos coeficientes de correlación con probabilidades menores que 0,05 (Manly 1997). Todos los cálculos de la prueba de aleatorización fueron realizados con el programa PopTools (Hood 2000).

Reducción de acetileno en troncos caídos

Se comparó la TRA *in situ* de las muestras de troncos caídos de cada clase de descomposición mediante análisis de varianza de una vía. Se calculó el promedio global de TRA de todas las muestras y fechas de incubación.

1.3.3. Estimación de entrada ecosistémica de N por FNS

De acuerdo al objetivo específico 4, se utilizaron los datos de tasas de reducción de acetileno (TRA) *in situ* de hojarasca y troncos caídos para estimar

el flujo de ingreso de N a nivel ecosistémico, teniendo en cuenta que la TRA es un estimador indirecto de la tasa de fijación biológica de N_2 (Hardy et al. 1968).

En el caso de la hojarasca, primero se estimó la “**reducción acumulada de acetileno**”, RAA_H , es decir, el área bajo la curva –o integral– del registro estacional de la tasa de reducción de acetileno de la hojarasca (ver Figura 12). RAA_H , fue estimada por tres métodos, propuestos en esta tesis, basados en distintos supuestos acerca del comportamiento de la tendencia temporal de TRA:

- i) Método de TRA promedio. Suponiendo un valor constante de TRA durante el período Mayo 2000-Febrero 2002, e igual al promedio de las medias de TRA observadas *in situ* durante dicho período. El área bajo la curva de TRA vs. tiempo se calcula entonces como la de un rectángulo.
- ii) Método del Polígono. Suponiendo un comportamiento lineal de TRA entre fechas consecutivas de muestreo en el registro Mayo 2000-Febrero 2002, es decir, se unieron los puntos consecutivos con líneas rectas y se calculó el área del polígono bajo la curva.
- iii) Método del Ajuste Sinusoidal. Suponiendo un comportamiento periódico sinusoidal de TRA a lo largo del tiempo, de acuerdo al ajuste de regresión descrito en la sección II.3.2 (Ecuación 2, sin corrección por tendencia de largo plazo). Luego se estimó el área bajo la curva por integración de la función en el intervalo de 0 a 365 días.

RAA_H es proporcional a la “**fijación acumulada**”, FA_H , esto es, la cantidad de N fijado durante el período de estudio por unidad de masa seca de hojarasca. La constante de proporcionalidad fue calculada bajo el supuesto de una razón molar de conversión C_2H_2 reducido : N_2 fijado de 3:1 (Hardy et al. 1968, Zuberer 1998, ver Introducción General). La cantidad de N que ingresa al ecosistema por unidad de superficie durante un año, a través del proceso de fijación no-

simbiótica de N_2 en la hojarasca, FN_H , se estimó multiplicando FA_H por la biomasa de hojarasca presente por unidad de superficie (B_H), es decir:

$$FN_H = FA_H \cdot B_H$$

Ecuación 4

B_H fue estimada según el procedimiento descrito en la siguiente sección, y se supuso que esta cantidad es constante durante todo el año. Este supuesto es razonable dado que el ecosistema en estudio es un bosque antiguo que se ha desarrollado en ausencia de grandes perturbaciones durante el Holoceno (Villagrán et al. 1990), y en consecuencia tanto su biomasa como necromasa se encuentran en estado estacionario. Por otra parte, el carácter siempreverde del bosque Nordpatagónico implica que no existen grandes fluctuaciones en la cantidad de hojarasca presente en el suelo.

La entrada anual de N por unidad de superficie a través de la fijación de N_2 en troncos caídos, FN_T , se estimó utilizando datos publicados de biomasa de troncos caídos en el sitio de estudio ($65,1 \text{ Mg ha}^{-1}$, Carmona et al. 2002), y el promedio de las medidas de TRA *in situ* en troncos de los ensayos de Noviembre 2000 y Febrero 2001. FN_T se calculó bajo el supuesto de que sólo la capa periférica de 10 cm de profundidad de los troncos caídos posee actividad significativa de FNS (Hendrickson 1988). En consecuencia, la biomasa activa de troncos caídos, B_T , se estimó en $43,9 \text{ Mg ha}^{-1}$. Como no se contó con un registro estacional de la TRA en troncos, se supuso que éstos presentan actividad significativa sólo durante 6 meses en el año, basado en lo observado en la hojarasca. La entrada total de N a través de la fijación no-simbiótica de N_2 en hojarasca y troncos, FN , fue estimada como la suma de FN_H y FN_T .

Se propuso un método para obtener el intervalo de confianza del 95% y error estándar de las estimaciones de FN , FN_H y FN_T , basado en el remuestreo con reposición (bootstrap, Manly 1997) simultáneo de los datos originales de

TRA y biomasa de hojarasca y troncos caídos, recalculando todos los parámetros involucrados (promedios de TRA, RAA_H , B_H y B_T), y repitiendo la operación 5000 veces. En el caso del método de ajuste sinusoidal se utilizó la metodología descrita en la sección "Análisis temporal". El error estándar y los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% se estimaron, respectivamente, como la desviación estándar y los percentiles 2,5% y 97,5% de la distribución de los pseudovalores generados para cada estimación. Este procedimiento se desarrolló con el programa PopTools (Hood 2002).

1.4. Resultados

1.4.1. Patrón estacional y espacial de la FNS *in situ*

La tasa promedio de reducción de acetileno *in situ* del bosque del Parque Nacional de Chiloé varió estacionalmente entre 0 y $85 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g (seco)}^{-1} \text{ día}^{-1}$, durante el período de observación. Los valores máximos ocurrieron en verano y los mínimos en invierno (Figura 9 A). El promedio anual de reducción de acetileno de hojarasca *in situ* fue de $10,8 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

El modelo sinusoidal de TRA *in situ* vs. tiempo explicó un 24% de la varianza de los datos (Tabla 2). Los máximos de la función sinusoidal coincidieron cualitativamente con los valores máximos de TRA promedio (Figura 12 B). Se verificó la existencia de una tendencia lineal significativa de largo plazo estimada en $0,020 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-2}$ (pendiente lineal, prueba de aleatorización: $P_{1\text{-cola}} = P_{2\text{-colas}} = 0,0005$). El ajuste sinusoidal sobre los residuales de la regresión lineal (i.e. datos de TRA *in situ* en los que se eliminó la tendencia lineal de largo plazo) resultó menor, pero significativo (Tabla 2).

Se observó una correlación significativa entre los promedios de TRA, la temperatura superficial del suelo y la iluminación incidente de cada fecha de muestreo (Figura 9, Tabla 3). La iluminación, a su vez, estuvo altamente correlacionada con la temperatura a lo largo del año (Tabla 3). La TRA promedio *in situ* no se correlacionó significativamente con el contenido hídrico de la hojarasca (Tabla 3). El patrón de temperatura observado durante los ensayos *in situ* en el Parque Nacional Chiloé fue similar al registrado en la Estación Biológica "Senda Darwin" (EBSD) (Figura 9 E). Sin embargo, el contenido hídrico de la hojarasca no reflejó las fluctuaciones de la precipitación registrada en la EBSD.

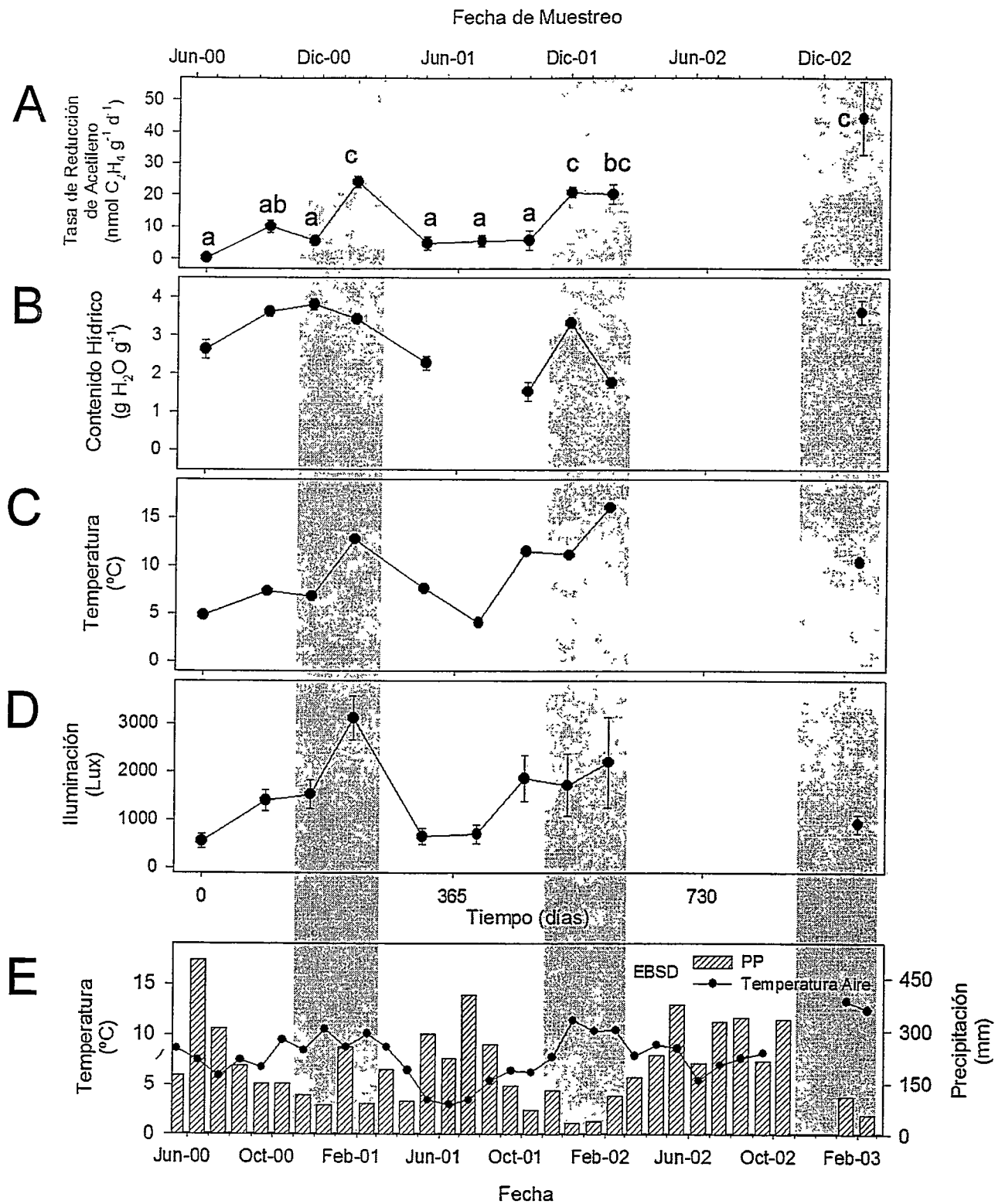


Figura 9
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 9

Tasas medias de reducción de acetileno (A), y variables físicas (B-D) registradas in situ durante los años 2000-2002 en bosque Nordpatagónico del Parque Nacional Chiloé. Valores promedio para cada fecha de muestreo. Barras de error = 1 Error Estándar. El número de muestras varió entre 5 y 54 (ver texto). Zonas sombreadas indican períodos estivales. Letras en TRA indican diferencias significativas entre medias según prueba a posteriori de Dunn (Kruskal-Wallis, $H_{(9)} = 104,307$, $P < 0,001$). Gráfico E: datos climáticos Estación Biológica "Senda Darwin".

Tabla 2.- Parámetros y estadísticos de análisis de regresión de función sinusoidal en el tiempo de las tasas de reducción de acetileno *in situ* y de los respectivos residuales de regresión lineal (eliminación de tendencia de largo plazo), entre Mayo 2000 y Febrero 2003. El período T se fijó en 365 días. Los valores de los parámetros corresponden a estimaciones de bootstrap \pm error estándar.

	Datos Originales	Residuales de regresión lineal
Modelo		
$\text{TRA} = \text{TRA}_0 + A \cdot \text{seno}\left(\frac{2\pi}{T} \cdot t + \delta\right)$		
Parámetros		
TRA ₀	12,584 \pm 0,868	-3,398 \pm 0,908
A	10,808 \pm 1,050	8,416 \pm 1,108
δ	4,174 \pm 0,133	4,136 \pm 0,172
T = 365 d (fijo)		
R ²	0,243	0,160
F _(2, 212)	34,08	20,242
P	< 0,0001	< 0,0001

Tabla 3.- Coeficientes de correlación de Spearman entre promedios de variables ambientales y tasas de reducción de acetileno (TRA) *in situ* registradas conjuntamente entre Mayo 2000 y Febrero 2003. Entre paréntesis se indica la probabilidad de dos colas de prueba de aleatorización.

	TRA (nmol C ₂ H ₄ g ⁻¹ d ⁻¹)	Contenido Hídrico	Temperatura
Contenido Hídrico (g H ₂ O g ⁻¹)	0,233 (0,529)	-	
Temperatura (°C)	0,673 (0,038)	-0,483 (0,183)	-
Iluminación (Lux)	0,661 (0,041)	-0,167 (0,680)	0,818 (0,003)

Los ensayos realizados en los periodos estivales en los puntos de la grilla experimental de 100 x 40 m instalada en el sitio de estudio, revelaron una alta heterogeneidad espacial de la fijación no simbiótica de N_2 (Figura 10 A y B, Tabla 4). El coeficiente de variación de la tasa de reducción de acetileno fluctuó entre 52% y 70% (Tabla 4). La actividad de reducción de acetileno *in situ* estival fue del mismo orden de magnitud que la reducción de acetileno medida en condiciones de laboratorio (20 °C), no encontrándose diferencias significativas entre la media de Enero del 2001 y la media del ensayo de laboratorio de Febrero del 2002 (Tabla 3). Sin embargo, la distribución de frecuencia de valores de TRA de laboratorio se ensanchó ligeramente hacia la derecha (Figura 10 C).

La prueba de Mantel indicó que no existió asociación estadísticamente significativa entre la distancia entre puntos y la respectiva diferencia de valores de TRA, para ninguno de los ensayos *in situ*, ni para el ensayo de laboratorio de Febrero del 2002 (Tabla 4). En consecuencia, no se encontró evidencia de autocorrelación espacial de los datos (ver análisis adicionales en Apéndice A). Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre los datos de TRA *in situ* de los mismos puntos medidas en Enero y Diciembre del 2001 ($r_{\text{Pearson}} = 0,145$, $P = 0,298$).

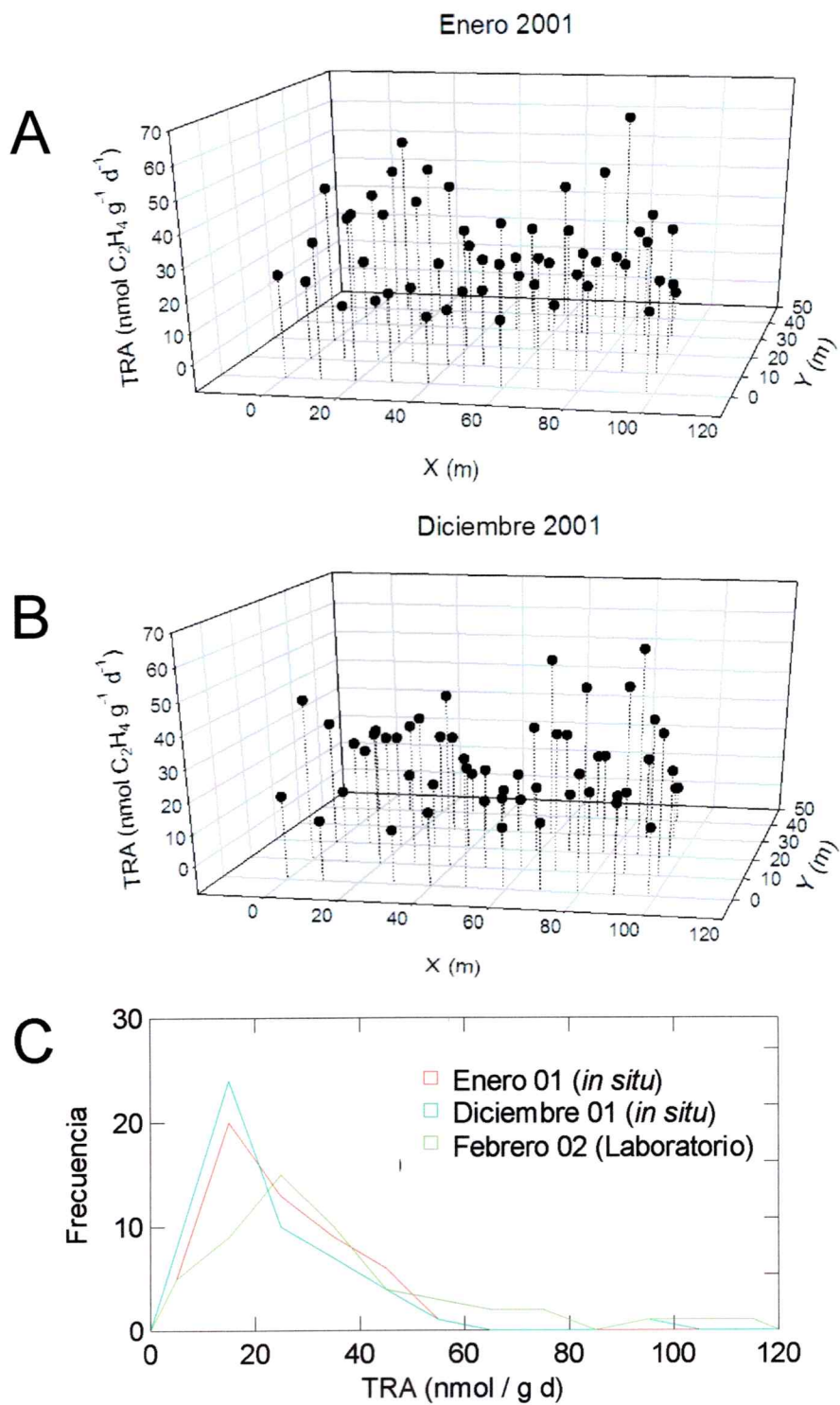


Figura 10
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 10

A y B: Variabilidad espacial de la tasa de reducción de acetileno (TRA) en la grilla experimental de 40 x 100 m durante los muestreos de Enero y Diciembre 2001. **C:** Comparación de distribuciones de frecuencia (polígonos) de TRA, incluyendo los datos del ensayo de laboratorio realizado en Febrero 2002.

Tabla 4.- Estadística descriptiva de las tasas de reducción de acetileno (unidades: $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) *in situ* de Enero 2001, Diciembre de 2001 y Febrero 2002, y de laboratorio de Febrero 2002. Además se indican los resultados de la prueba de Mantel de una y dos colas (autocorrelación espacial). Finalmente se indica el resultado de comparación no paramétrica entre ensayos (Kruskal-Wallis, prueba *a posteriori* de Dunn).

Parámetro/Estadístico	<i>In situ</i>			Laboratorio (20°C)
	Enero 2001	Diciembre 2001	Febrero 2002	Febrero 2002
Nº puntos de muestreo (n)	54	52	22	52
Promedio	24,1	20,9	20,7	33,0
Mediana	21,1	18,2	15,9	27,2
Varianza	159,4	157,8	259,0	441,2
Coefficiente de Variación (%)	52,3	60,0	77,9	71,6
Rango (Min-Max)	0,8 - 59,7	0.0 - 58,0	5,6 - 78,7	1,3 - 112,3
Correlación de Mantel	0,025	-0,038	0,121	0,083
Probabilidad 1 cola	0,302	0,226	0,153	0,099
Probabilidad 2 colas	0,619	0,440	0,243	0,175
Kruskal-Wallis				
$H_{(3)} = 12,555$ (P = 0,006)				
Prueba de Dunn (<i>Posteriori</i>)	ab	a	a	b

I.4.2. Fijación no-simbiótica de N₂ en troncos caídos

El promedio de la tasa de reducción de acetileno *in situ* de troncos caídos de diámetro mayor de 5 cm fluctuó entre 4,8 (Noviembre 2000) y 10,2 (Febrero 2001) nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹, con un promedio global de 7,5 nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹. En el ensayo de Febrero del 2001, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad de reducción de acetileno correspondiente a los distintos estados o clases de descomposición (análisis de varianza de una vía, $F_{(4,29)} = 0,926$, $P = 0,462$) (Figura 11).

I.4.3. Biomasa de hojarasca

La biomasa total de hojarasca depositada sobre el suelo del bosque del Parque Nacional Chiloé en Febrero del 2002 fue estimada en 4,5 Mg ha⁻¹, y presentó una alta heterogeneidad espacial (CV = 71.4%) (Tabla 5).

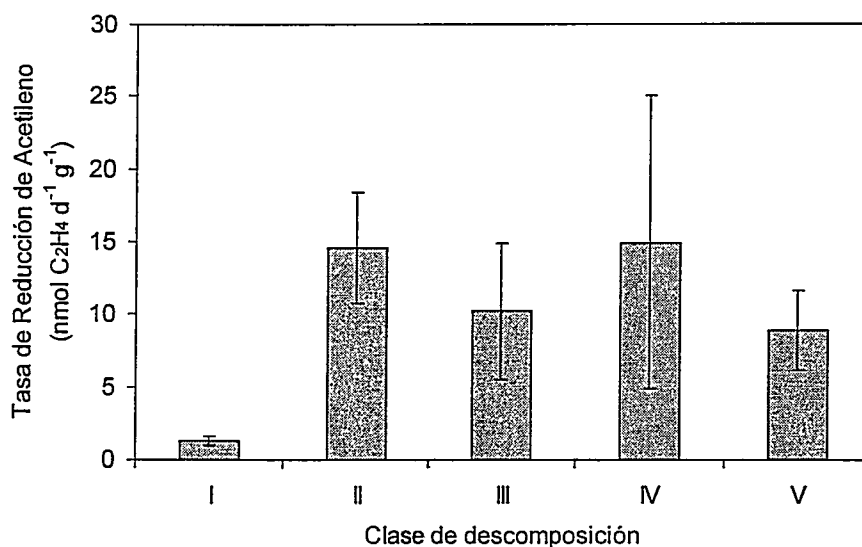


Figura 11

Tasas promedio de reducción de acetileno *in situ* de Febrero 2001 en troncos caídos, clasificados según su estado o clase de descomposición (Maser et al. 1999). I-II = Troncos recientemente despositados sobre el suelo; descomposición reciente, III = descomposición intermedia, IV-V = descomposición avanzada. Barras de error representan 1 EE (n = 7, excepto Clase I con n = 6). No existen diferencias significativas entre Clases (ANOVA, $F_{(4,29)} = 0,926$, $P = 0,462$).

Tabla 5.- Estimación de la biomasa de hojarasca del bosque Nordpatagónico del Parque Nacional Chiloé. Se colectaron 55 muestras al azar con un cuadrante de 20 x 20 cm. Se muestra la caracterización estadística de los datos, estimación de bootstrap (5000 iteraciones) e intervalo de confianza (IC) del 95%.

Parámetro	Valor
Promedio (g m^{-2})	454,3
Desviación Estándar (g m^{-2})	324,1
Varianza ($\text{g}^2 \text{m}^{-4}$)	10.5072,9
Coefficiente de Variación (%)	71,4
Biomasa Total (Mg ha^{-1})	
Estimación de Bootstrap	4,52
EE	0,45
IC 95%	3,69 - 5,43

I.4.4. Estimación de la entrada ecosistémica de N por FNS

La reducción acumulada de acetileno de la hojarasca (RAA_H) se estimó a partir de los gráficos de TRA en función del tiempo, por el método del polígono (Figura 12 A), y el método del ajuste sinusoidal (Figura 12 B). También se estimó a partir del promedio anual de TRA. Las estimaciones de RAA_H , para un período de 365 días, fluctuaron entre 3.578 y 3.951 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$, dependiendo del método utilizado. Para el caso de los troncos caídos, RAA_T se estimó en 1.351 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ (método de TRA promedio).

El valor de entrada total de N a través de la fijación no-simbiótica de N_2 estimado fluctuó entre 0,72 y 0,75 $\text{Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, dependiendo del método de estimación de RAA_H (Tabla 6). La entrada de N a través de la fijación en troncos caídos fue mayor que la de la hojarasca (0,6 vs. 0,2 $\text{Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) (Tabla 6).

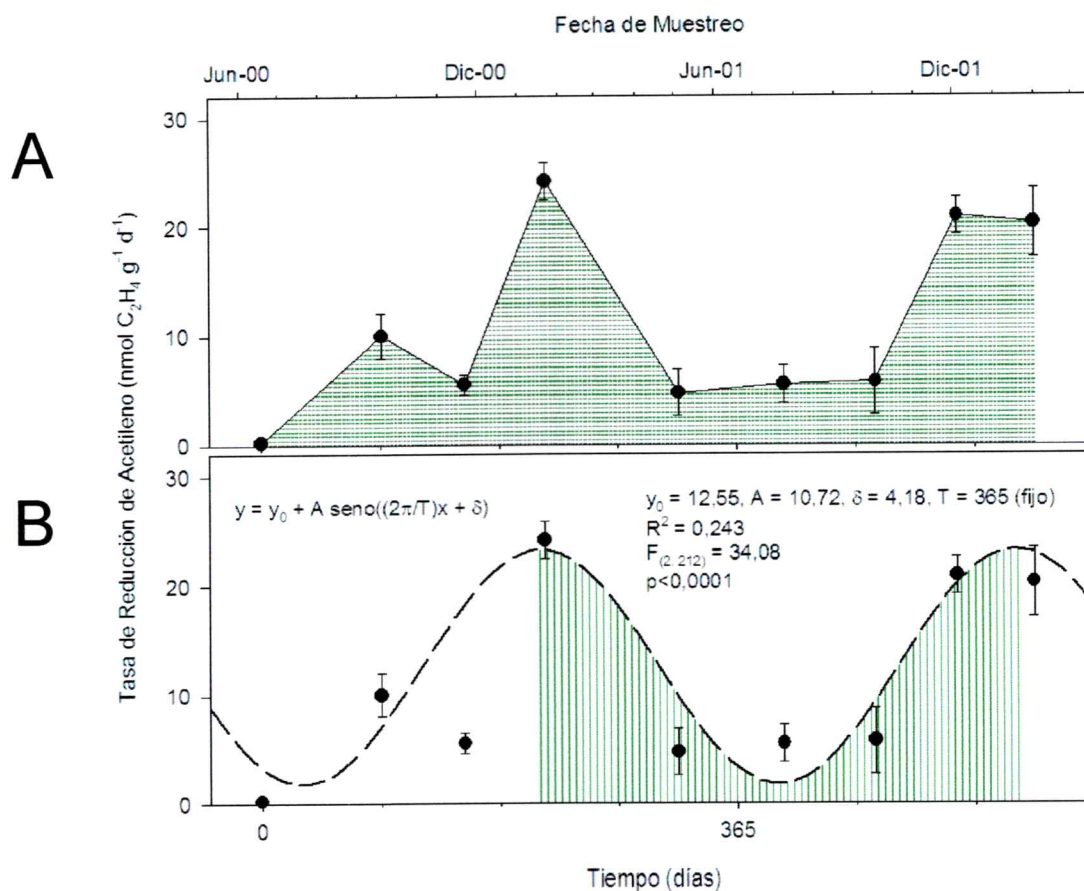


Figura 12

Estimación del área bajo la curva de la tasa de reducción de acetileno en el tiempo (sombreado verde), para el cálculo de la entrada ecosistémica anual de N a través de FNS en hojarasca. En **A** se supone un comportamiento lineal de TRA entre los promedios de cada fecha de muestreo (método del polígono), y en **B** se calculó la integral sobre un período de 365 días de la función sinusoidal ajustada a los datos sin promediar.

Tabla 6.- Estimación de la entrada anual de N a través de fijación no-simbiótica de N₂ en hojarasca y troncos caídos de un bosque templado lluvioso Nordpatagónico del Parque Nacional Chiloé, a través de distintos métodos. Estimaciones de bootstrap \pm EE e intervalo de confianza (95%) entre paréntesis.

Substrato	Método de estimación	Entrada anual (Kg N ha⁻¹ año⁻¹)
Residuos leñosos gruesos	TRA promedio (6 meses activos año ⁻¹)	0,554 \pm 0,189 (0,257 - 0,996)
Hojarasca	TRA promedio	0,167 \pm 0,019 (0,131 - 0,207)
	Area bajo curva TRA vs. Tiempo (polígono)	0,180 \pm 0,021 (0,142 - 0,223)
	Area bajo curva TRA vs. Tiempo (ajuste sinusoidal)	0,193 \pm 0,023 (0,150 - 0,242)
Total	TRA promedio	0,721 \pm 0,190 (0,416 - 1,165)
	Area bajo curva TRA vs. Tiempo (polígono)	0,734 \pm 0,191 (0,429 - 1,179)
	Area bajo curva TRA vs. Tiempo (ajuste sinusoidal)	0,747 \pm 0,185 (0,449 - 1,173)

I.5. Discusión

I.5.1 Patrón estacional de la fijación no-simbiótica de N₂.

Los resultados indican que existe una tendencia estacional del proceso de fijación biológica de N₂ en la capa de hojarasca del bosque Nordpatagónico del Parque Nacional Chiloé, asociada a los cambios de temperatura y radiación solar durante el ciclo anual (Figura 9, Tabla 3). La radiación solar fue estimada indirectamente por la iluminación recibida por la capa de hojarasca del bosque. Las fluctuaciones del contenido hídrico de la hojarasca no reflejaron la variación estacional de la precipitación, probablemente debido a que el sitio de estudio se encuentra entre uno de los más lluviosos del globo (ca. 5800 mm anuales), y la distribución de las lluvias es relativamente uniforme (baja estacionalidad) durante el año (Arroyo et al. 1995), lo cual produce un contenido hídrico de la hojarasca relativamente constante. Se determinaron experimentalmente los efectos directos de la temperatura, iluminación y contenido hídrico del detritus sobre la FNS, que son discutidos en el Capítulo III.

La tasa media anual y el valor máximo de reducción de acetileno observados en la hojarasca del sitio de estudio (10,8 y 78,7 nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹, respectivamente), se encuentran dentro del rango de tasas máximas de reducción de acetileno documentadas para otros ecosistemas forestales templados (4,3 – 364,8 nmol g⁻¹ d⁻¹, Hendrickson 1990, Silvester 1989, Jurgensen et al. 1992, Cushon & Feller 1989) y son similares a la documentada para un bosque esclerófilo australiano (28,8 nmol g⁻¹ d⁻¹, O'Connell & Grove 1987).

I.5.2. Fijación de N₂ en troncos caídos.

Los troncos caídos son un tipo particular de detritus vegetal, especialmente abundante en ecosistemas forestales templados, que ciertamente también forma parte de la detritósfera (Harmon et al. 1986, Carmona et al. 2002). La actividad media estival de fijación de N₂ *in situ* registrada en los troncos caídos (7,5 nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹) fue similar a la reportada recientemente para residuos leñosos de bosques antiguos de *Thuja* en Canadá (5,7 nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹, Brunner & Kimmins 2003) y se encuentra dentro del rango de tasas máximas de reducción de acetileno documentadas para troncos caídos de otros ecosistemas forestales boreales (32,9 nmol C₂H₄ g⁻¹ d⁻¹, Hendrickson 1988) y templados (0,7 – 67,2 nmol g⁻¹ d⁻¹, Griffiths et al. 1993, Silvester 1989, Crawford et al. 1997, Jurgensen et al. 1989, 1992, Cushon & Feller 1989). La tasa media de reducción de acetileno en troncos caídos fue menor que la de la hojarasca (7,5 vs. 10,8 nmol g⁻¹ d⁻¹), lo cual implica que existen diferencias en la capacidad de ambos sustratos de albergar poblaciones activas de diazótrofos. A diferencia de lo observado por Hicks et al. (2003) y Brunner & Kimmins (2003), no se detectaron diferencias en la actividad diazotrófica *in situ* de troncos en distintas etapas de descomposición (Figura 11). Este resultado es discutido en mayor detalle en el Capítulo II.

I.5.3. Flujo de N a través de fijación no-simbiótica

El resultado de la estimación del flujo de entrada de N a través de la FNS es discutido en la parte final de este documento (Discusión general). Aquí cabe mencionar que dicha estimación es de carácter indirecto por cuanto está basada en la reducción de un sustrato alternativo de la enzima nitrogenasa. Como se mencionó en la metodología general, existe una razón de conversión molar entre el acetileno reducido y el N₂ fijado que depende de la complejidad

del sustrato e incluso de las condiciones abióticas (Myrold et al. 1999, Hicks et al. 2003, Zuberer 1998), por lo que constituye una fuente de error adicional a la estimación de flujo de N por la FNS. Sin embargo, es posible estimar experimentalmente dicha razón mediante un ensayo simultáneo de reducción de acetileno y fijación de ^{15}N (Myrold et al. 1999). Se han estimado valores para sustratos orgánicos de bosques templados y tropicales del hemisferio norte que han fluctuado alrededor de 4 (Hicks et al. 2003, Thompson & Vitousek 1997). Zuberer (1998) menciona que esta razón puede variar entre 1,5 y 25, dependiendo del sistema estudiado. En consecuencia, las estimaciones basadas en tasas de reducción de acetileno deben ser consideradas con cautela, ya que probablemente estén sobreestimado la actividad diazotrófica. Sin embargo, como se verá en los siguientes capítulos, la tasa de reducción de acetileno es apropiada para comparar la FNS de distintos sustratos orgánicos.

CAPÍTULO II

FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N₂ Y DESCOMPOSICIÓN DEL DETRITUS ORGÁNICO

La fijación no-simbiótica de N₂ puede considerarse como un subproceso del fenómeno más general de la descomposición de materia orgánica. Ambos procesos biogeoquímicos ocurren en el mismo hábitat de la detritósfera y, en consecuencia, ambos pueden ser afectados por las mismas variables abióticas y características fisicoquímicas y biológicas del substrato orgánico.

La descomposición del detritus puede describirse en términos simples como la disminución progresiva de la masa seca del substrato, producto de la degradación microbiana, ya sea por respiración heterotrófica (producción de CO₂) y/o humificación, ambos procesos que “extraen” carbono desde el detritus (Chapin et al. 2002, Harmon et al. 1999). Esta disminución en masa y en carbono normalmente se aproxima a un decaimiento exponencial a lo largo del tiempo. Sin embargo, el resto de los elementos contenidos en el detritus pueden seguir dinámicas distintas a medida que transcurre la descomposición (Laskowski et al. 1995), incluso llegando a acumularse en el detritus antes de ser liberados (mineralizados). Tal es el caso del N.

Se ha documentado que existe una acumulación neta de N durante las primeras etapas de la descomposición de substratos deficientes en N (i.e. con C/N mayor) (Aber & Melillo 1991, Laskowski et al. 1995, Thompson & Vitousek

1997, Vitousek et al. 2002a y Wagener & Schimel 1998, Woitchik et al. 1997), que ha sido descrita en términos teóricos por Ågren & Bosatta (1996). Esta acumulación generalmente se ha atribuido a la inmovilización microbiana de NID "desde los alrededores" (Ågren & Bosatta 1996), producto del requerimiento de N por parte de la comunidad microbiana para su propia mantención y biosíntesis de enzimas degradadoras (Meyer 1994, Vitousek et al. 2002a). Sin embargo esta acumulación también puede explicarse por ingreso de N a través de la actividad diazotrófica en el detritus pobre en N (e.g. Woitchik et al. 1997).

En este capítulo se investigó la relación entre la FNS y el proceso de descomposición a través del estudio de la variación de la FNS a lo largo del primer año de descomposición de substratos con distintos contenidos iniciales de N (y diferentes C/N) pertenecientes a las especies arbóreas dominantes del bosque NordPatagónico (*N. nitida* y *D. winteri*).

II.1. Hipótesis de trabajo

Se postula un aumento de la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 (FNS) durante los primeros meses de la descomposición de substratos pobres en N (mayor C/N), coincidente con un aumento del contenido total de N. En substratos ricos en N (C/N menor) se espera un menor aumento de la FNS (Figura 13).

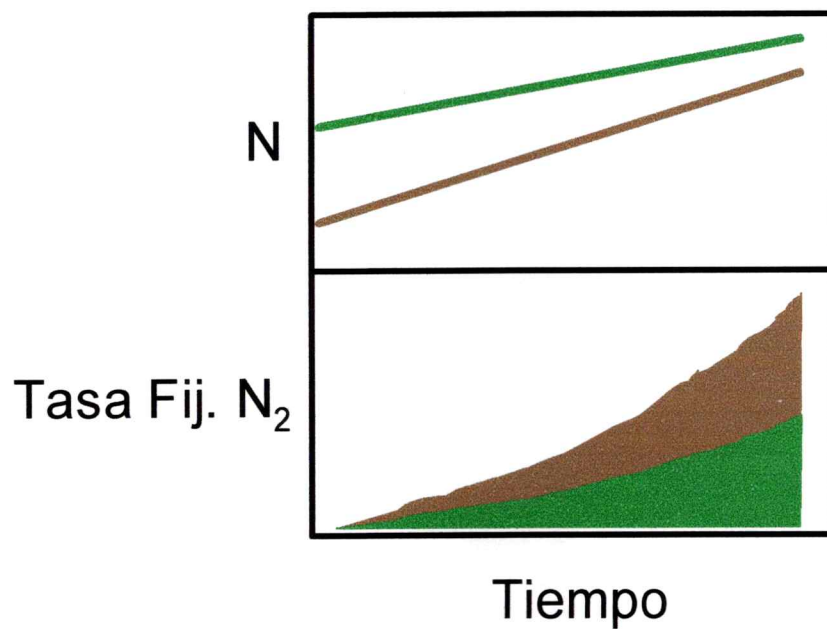


Figura 13

Representación gráfica de la hipótesis del comportamiento de la FNS durante el primer año de descomposición del detritus orgánico: la actividad diazotrófica aumenta en el tiempo y es mayor en sustratos con menor contenido inicial de N.

II.2. Objetivo específico

Relacionar empíricamente los procesos de fijación no-simbiótica de N_2 y descomposición de la materia orgánica, observando simultáneamente ambos procesos en:

- a) Material leñoso (1-5 cm de diámetro) de *N. nitida*, y
- b) Hojarasca de alto y bajo contenido inicial de N (baja y alta relación C/N) de *N. nitida* y *D. winteri*.

II.3. Materiales y métodos

Se diseñaron experimentos de descomposición *in situ* de material leñoso y hojarasca con el método de bolsa de maya (Bocock & Gilbert 1957, Harmon et al. 1999, Figura 14), en los que se monitoreó aproximadamente cada dos meses la actividad de reducción de acetileno (*in situ* y en laboratorio) de las muestras.

II.3.1. Material Leñoso

Se observó la dinámica de descomposición y FNS en material leñoso de grosor intermedio (1 - 5 cm de diámetro) de *Nothofagus nitida*. El material fue colectado de árboles vivos en un bosque cercano al sitio de estudio del Parque Nacional Chiloé, y fue trasladado al laboratorio en donde fue secado en estufa a 70 °C por 72 h. Se colocaron muestras de masa seca conocida (ca. 140 g) de material dentro de 80 bolsas de maya de 2 mm de tamaño de orificio, las que fueron distribuidas al azar en 6 puntos espaciados cada 10 m a lo largo de un transecto lineal de 50 m en el bosque del Parque Nacional Chiloé.

Aproximadamente cada dos meses, se realizaron ensayos de reducción de acetileno *in situ* con las muestras de cada punto, las que fueron retiradas para determinar su masa seca (secado en estufa a 70 °C por 72 h) y la fracción de masa seca remanente del substrato en descomposición. Al final del experimento, se abarcó un período de descomposición de 797 días.

II.3.2. Material foliar

Se comparó la dinámica de descomposición y fijación no-simbiótica de N₂ de hojas verdes arrancadas de árboles vivos y hojarasca senescente capturada en trampas de hojarasca (post-abscisión) de dos especies arbóreas dominantes: *N. nitida* y *D. winteri*. Se consideró que en general las hojas verdes tienen un menor contenido de N que las hojas senescentes, ya que en estas últimas ha operado el proceso de reabsorción de nutrientes pre-abscisión por parte de los árboles (Chapin et al. 2002). El material utilizado fue colectado en el Parque Nacional Chiloé y secado en el laboratorio. Se colocó una cantidad inicial de masa seca conocida (ca. 10 g) correspondiente a cada especie y tipo de hojarasca dentro de bolsas de maya de 2 mm de tamaño de poro (ca. 50 bolsas por especie/tipo). Las bolsas fueron distribuidas en 6 puntos espaciados cada 10 m y alineados a lo largo de un transecto de 50 m en el bosque Nordpatagónico maduro de la estación biológica "Senda Darwin". Las muestras de *N. nitida* se instalaron en Enero 2002, y las de *D. winteri*, en Abril 2002. Aproximadamente cada dos a cuatro meses se realizaron ensayos de reducción de acetileno *in situ* y se retiraron muestras para determinar su masa seca y fracción de masa remanente (Figura 14). Además se realizaron ensayos de reducción de acetileno en condiciones de laboratorio (20 °C) con las muestras colectadas (antes del secado). Finalmente, se determinó el contenido total de N y C de un subconjunto de las muestras colectadas, según el protocolo descrito

en la siguiente sección (II.3.3). Este experimento abarcó un periodo de descomposición de 449 días para *N. nitida* y 365 días para *D. winteri*.

II.3.3. Determinación de C y N total.

Las muestras secas de hojarasca fueron trituradas con un molino metálico manual y posteriormente pulverizadas con un molino eléctrico. Una submuestra de 8 a 13 mg fue analizada por el método de combustión instantánea en un analizador automático de elementos Carlo Erba (NA 2500), en cual entrega los datos en porcentaje de cada elemento con respecto a la masa seca (o bien, g C ó N 100 g⁻¹). El proceso de triturado y posterior pulverizado de las muestras maximizó la homogenización de las mismas, aumentando la probabilidad de que la submuestra analizada fuera representativa de toda la muestra original.



Figura 14

Experimento de descomposición y fijación de N_2 *in situ* de hojarasca. Las bolsas de malla verde contienen muestras de hojarasca verde y senescente de *N. nitida* y *D. winteri*, cuya masa seca inicial es conocida. Periódicamente se midió la actividad de reducción de acetileno de las muestras, a medida que avanzó su descomposición.

II.3.4. Análisis estadísticos

Composición química inicial del material foliar

El contenido inicial de N y C y la relación C/N de las hojas verdes y senescentes (post-abscisión) de las dos especies estudiadas se compararon mediante análisis de varianza de dos vías, con la especie y el tipo de hojas como factores.

ANDEVA de medidas repetidas

La fracción de masa remanente, la tasa de reducción de acetileno (TRA *in situ* y de laboratorio), y el contenido de N medidos en los distintos momentos de la descomposición de los substratos (fechas de muestreo) fueron comparadas mediante análisis de varianza con medidas repetidas (Zar 1996), con el tiempo como factor repetido (programa STATISTICA). La TRA (*in situ* y de laboratorio) se transformó a logaritmo natural [$\ln(1+TRA)$]. En el caso de la hojarasca, además se consideró el tipo de hojarasca (verde versus senescente) como factor de comparación. Los datos de hojarasca de *N. nitida* y *D. winteri* fueron analizados por separado debido al desfase temporal de ambos experimentos.

Dinámica de la TRA

La tendencia general de la TRA en función del tiempo de descomposición de cada substrato se describió a través de la pendiente lineal, cuya significancia estadística fue determinada por una prueba de aleatorización (remuestreo sin reposición de la TRA, recálculo de pendientes, repetición 2000 veces y comparación de pendientes observadas y esperadas por azar). Se obtuvieron estimaciones de bootstrap de todas las pendientes y sus errores estándar.

En el caso de la hojarasca, se realizó una prueba de aleatorización para comparar las pendientes de TRA vs. tiempo de hojas verdes u senescentes

(para cada especie por separado). Para esto se realizaron 2000 reasignaciones aleatorias los datos de TRA en ambos tipos de sustrato, recalculando la diferencia entre pendientes (pendiente de hojas senescentes menos pendiente de hojas verdes) y comparando la diferencia observada con la distribución de diferencias esperadas por azar.

Dinámica de descomposición y contenido de N

La fracción de masa remanente en función del tiempo de descomposición de todos sustratos se ajustaron con modelos de regresión lineal y exponencial negativo, este último según la siguiente ecuación:

$$m(t) = A \cdot e^{-kt}$$

Ecuación 5

donde $m(t)$ es la fracción de masa remanente al tiempo t , A es una constante [$A = m(0)$] y k es la constante de decaimiento exponencial, que en este caso corresponde a un estimador de la constante de descomposición del sustrato (Ågren & Bosatta 1996, Harmon et al. 1999). Adicionalmente, se obtuvieron estimaciones de bootstrap de k siguiendo un procedimiento similar al explicado en la sección 1.3.2 (Análisis temporal).

Se compararon las k de hojas verdes y senescentes (post abscisión) de cada especie mediante una prueba de aleatorización. Se calculó la diferencia observada entre valores de k y se comparó con una distribución nula de diferencias esperada por azar, construida mediante reasignación aleatoria (remuestreo sin reposición) de los valores de fracción de masa remanente y fecha de muestreo de ambos tipos de sustrato y posterior re-estimación de las respectivas k y la diferencia entre ellas. Todo el procedimiento se repitió 5000 veces y se calculó la probabilidad de 2 colas como el número de valores mayores o iguales, en valor absoluto, a la diferencia observada partido por el número total de iteraciones.

Los datos de contenido total de N en función del tiempo se ajustaron con modelos de regresión lineal y cuadrático.

Fijación acumulada de N₂

Se estimó la cantidad de fijación de N₂ ocurrida durante la descomposición de cada sustrato, mediante el cálculo de la reducción acumulada de acetileno (RAA) durante el período total y los primeros 365 días de descomposición, a través del método del polígono y la estimación de bootstrap respectiva, descritos en el Capítulo I (sección I.3.2 Estimación de entrada ecosistémica...). Este método supone un comportamiento lineal de TRA vs. tiempo entre fechas sucesivas de muestreo.

Se comparó la RAA a los 365 días de la hojarasca verde y senescente en cada especie aplicando una prueba de aleatorización, calculando la diferencia observada entre las RAA respectivas y comparándola con una distribución de diferencias de RAA esperada por azar (distribución nula), construida mediante reasignación aleatoria (remuestreo sin reposición) de los valores de TRA vs. fecha de muestreo de ambos tipos de sustrato y posterior re-estimación de las respectivas RAA y la diferencia entre ellas. El procedimiento fue repetido 5000 veces y se calculó la probabilidad de una cola como el número de diferencias mayores o iguales a la observada dividido por el número total de iteraciones. De igual forma se calculó la probabilidad de 2 colas considerando el valor absoluto de las diferencias.

II.4. Resultados

II.4.1. Material leñoso

La dinámica de pérdida de masa por descomposición, resultó ser extremadamente lenta. No se detectó un cambio significativo de la fracción de masa remanente durante un período de más de 23 meses (Figura 15; análisis de varianza con medidas repetidas, $F_{(4,16)} = 1,324$, $P = 0,303$). Sin embargo, si hubo cambios significativos en la TRA (análisis de varianza con medidas repetidas, $F_{(7,35)} = 20,195$, $P < 0,001$). La dinámica de la actividad de FNS resultó ir creciendo paulatinamente, hasta alcanzar un máximo en el verano del 2001/02, para luego decrecer levemente en el verano siguiente (Febrero 2003) (Figura 15). Sin embargo, la tendencia lineal de la TRA en función del tiempo fue positiva y significativa (Tabla 9). La reducción acumulada de acetileno durante los primeros 365 días de la descomposición del material leñoso fue estimada en $887 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ (Tabla 12).

II.4.2. Material Foliar

Las hojas verdes y senescentes de las dos especies estudiadas difirieron significativamente en su contenido de carbono, nitrógeno y relación C/N iniciales (Tabla 7). La hojarasca senescente fue más pobre en N que la hojarasca verde, y *D. winteri* tuvo un menor contenido de N que *N. nitida* (Tabla 7). Los registros de pérdida de masa, contenido de total de N y fijación de N_2 (TRA) se muestran en las Figuras 16 y 17. Durante el período observado, no se detectaron diferencias significativas en la fracción de masa remanente y la TRA *in situ* y en el laboratorio entre los dos tipos de hojarasca (verde vs. senescente) de ambas especies (Tabla 8). Sin embargo, las diferencias en contenido de N entre hojarasca verde y senescente se mantuvieron durante el periodo

observado (Tabla 8). La variación temporal de TRA *in situ* fue significativa (Tablas 8 y 9, Figuras 16 y 17). En general, la TRA aumentó a través del tiempo en todos los sustratos, aunque con fluctuaciones. Las respectivas pendientes de TRA vs. tiempo fueron significativas, pero no se encontraron diferencias significativas entre tipos de hojarasca para ambas especies (Tabla 9). El contenido total de N experimentó un aumento leve pero significativo (Figuras 16 y 17, Tabla 8).

En la especie *N. nitida*, los datos de fracción de masa remanente de la hojarasca verde vs. tiempo se ajustaron mejor al modelo de decaimiento exponencial. En la hojarasca senescente, en cambio el mejor ajuste se obtuvo con el modelo lineal (Tabla 10). En el caso de *D. winteri*, se observó el mismo patrón (pérdida de masa de hojas verdes se ajustó a modelo de decaimiento exponencial y en hojas senescentes, al modelo lineal, Tabla 10). El contenido de N en función del tiempo se ajustó mejor al modelo cuadrático en todos los casos (Tabla 10). En *N. nitida*, la estimación de bootstrap de la constante de descomposición (k) fue ligeramente mayor en hojas verdes que en hojas senescentes post-abscisión, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 11). En cambio, en *D. winteri*, k fue mayor en hojas senescentes, y la diferencia fue estadísticamente significativa según la prueba de aleatorización realizada (Tabla 11).

Se observaron diferencias en la magnitud de la "reducción acumulada de acetileno" (RAA) de cada sustrato (Tabla 12). En el caso del material foliar de *N. nitida*, la RAA durante los primeros 365 días fue mayor en hojas senescentes post-abscisión que en hojas verdes, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa según la prueba de aleatorización ($P_{1\text{-cola}} = 0,125$, $P_{2\text{-colas}} = 0,179$). En *D. winteri* se observó el mismo patrón ($P_{1\text{-cola}} = 0,395$, $P_{2\text{-colas}} = 0,808$).

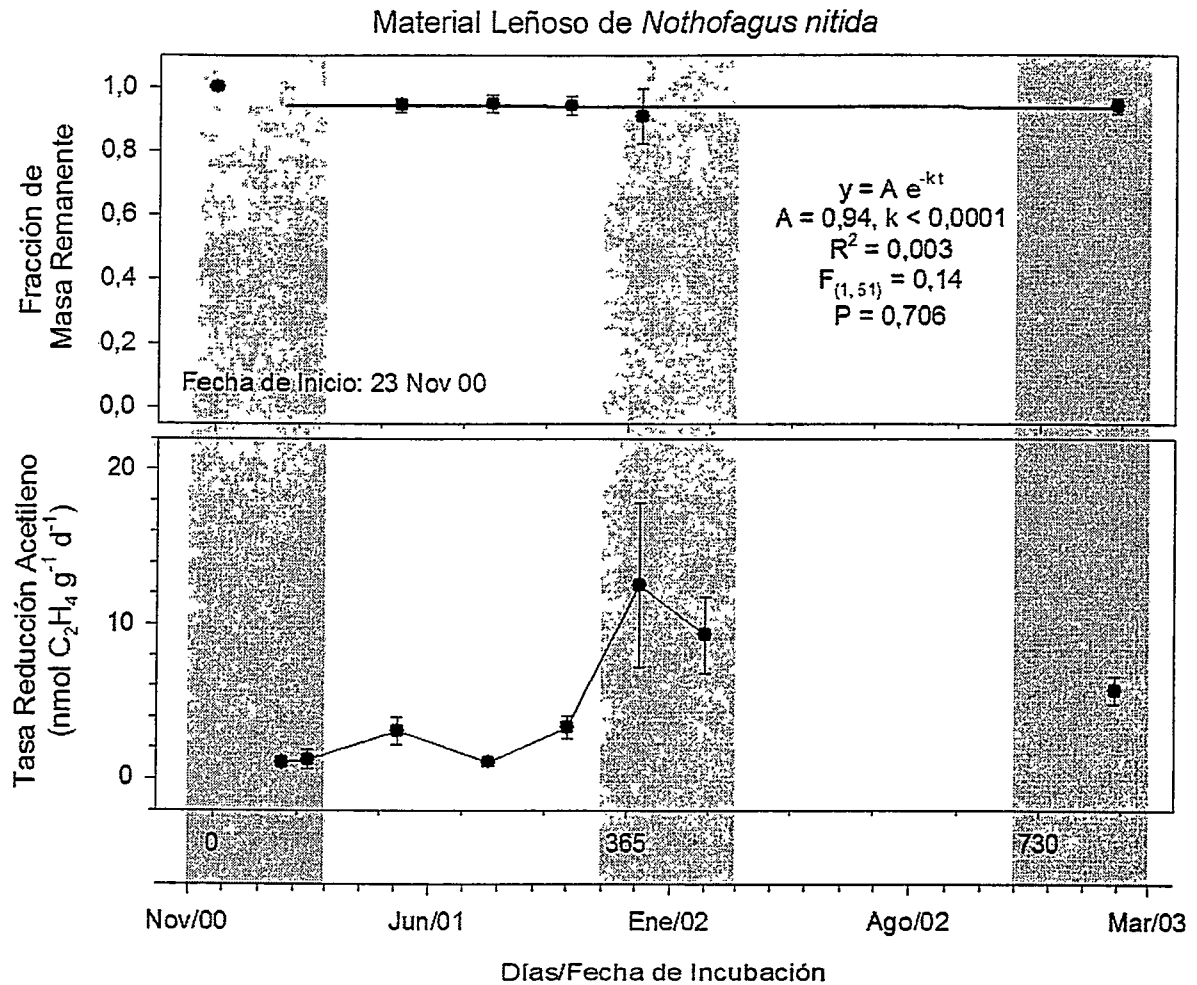


Figura 15

Experimento conjunto de fijación de N_2 (reducción de acetileno) y descomposición in situ de muestras de material leñoso de *Nothofagus nitida* (1-5 cm diámetro). Las muestras fueron colocadas en el sitio de estudio del Parque Nacional Chiloé, dentro de bolsas de malla de 2 mm (tamaño de poro) el 23 de noviembre de 2000. Gráfico superior: dinámica de pérdida de masa. Los puntos corresponden a promedios de fracción de masa remanente \pm DE ($n = 6$). Se indica curva de ajuste exponencial negativo. Gráfico inferior: dinámica de tasa de reducción de acetileno. Los puntos corresponden a promedios \pm EE ($n = 6$). Areas sombreadas indican estación de crecimiento.

Tabla 7.- Composición química inicial de la hojarasca utilizada en el experimento de descomposición y fijación de N₂ *in situ*. Valores promedio y error estándar (entre paréntesis) de n = 6 muestras de hojarasca correspondiente a cada especie (*D. winteri* y *N. nitida*) y tipo (senescente y verde). Se indican los estadísticos F y probabilidad, entre paréntesis, de prueba de ANOVA de dos vías. Letras junto a valores indican diferencias significativas según prueba *a posteriori* de Tukey. Las distribuciones de las variables cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Variable	<i>Nothofagus nitida</i>		<i>Drimys winteri</i>		F _(1,20)	
	Senescente	Verde	Senescente	Verde	ANOVA 2 vías	
					Especie	Tipo
Carbono (g C 100 g ⁻¹)	52,93 ^c (0,07)	52,21 ^b (0,08)	52,18 ^b (0,27)	50,61 ^a (0,10)	60,665 (< 0,001)	57,995 (< 0,001)
Nitrógeno (g N 100 g ⁻¹)	0,70 ^b (0,01)	0,93 ^c (0,02)	0,63 ^a (0,02)	0,76 ^b (0,01)	50,895 (< 0,001)	118,399 (< 0,001)
Razón C:N	75,94 ^c (1,51)	56,08 ^a (1,14)	82,69 ^d (2,49)	66,59 ^b (0,84)	28,454 (< 0,001)	123,545 (< 0,001)

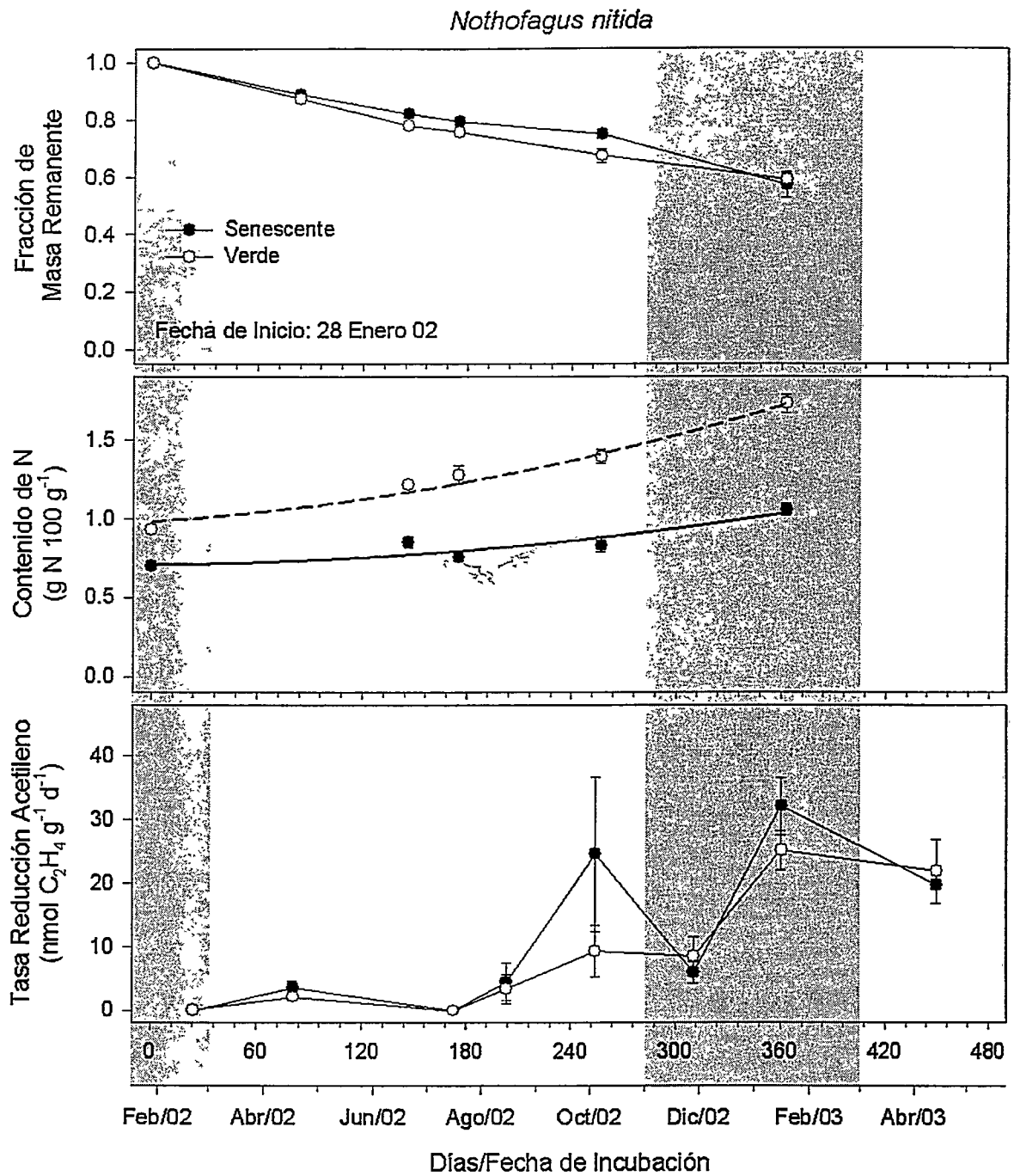


Figura 16
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 16

Experimento conjunto de fijación de N_2 (reducción de acetileno) y descomposición *in situ* de muestras de hojarasca verde y senescente de *Nothofagus nitida*. Las muestras fueron colocadas en el sitio de estudio de la Estación Biológica senda Darwin, Chiloé, dentro de bolsas de malla (2 mm de tamaño de poro) el 28 de enero de 2002. Gráfico superior: dinámica de pérdida de masa. Los puntos corresponden a promedios de fracción de masa remanente \pm EE ($n = 6$). Se indica curva de ajuste exponencial negativo. Gráfico intermedio: dinámica del contenido de N total del detritus. Puntos corresponden a promedios \pm EE ($n = 3$). Se muestra curvas de ajuste exponencial. Gráfico inferior: dinámica de tasa de reducción de acetileno. Los puntos corresponden a promedios \pm EE ($n = 5 - 6$), y están unidos por rectas. Áreas sombradas indican estación de crecimiento.

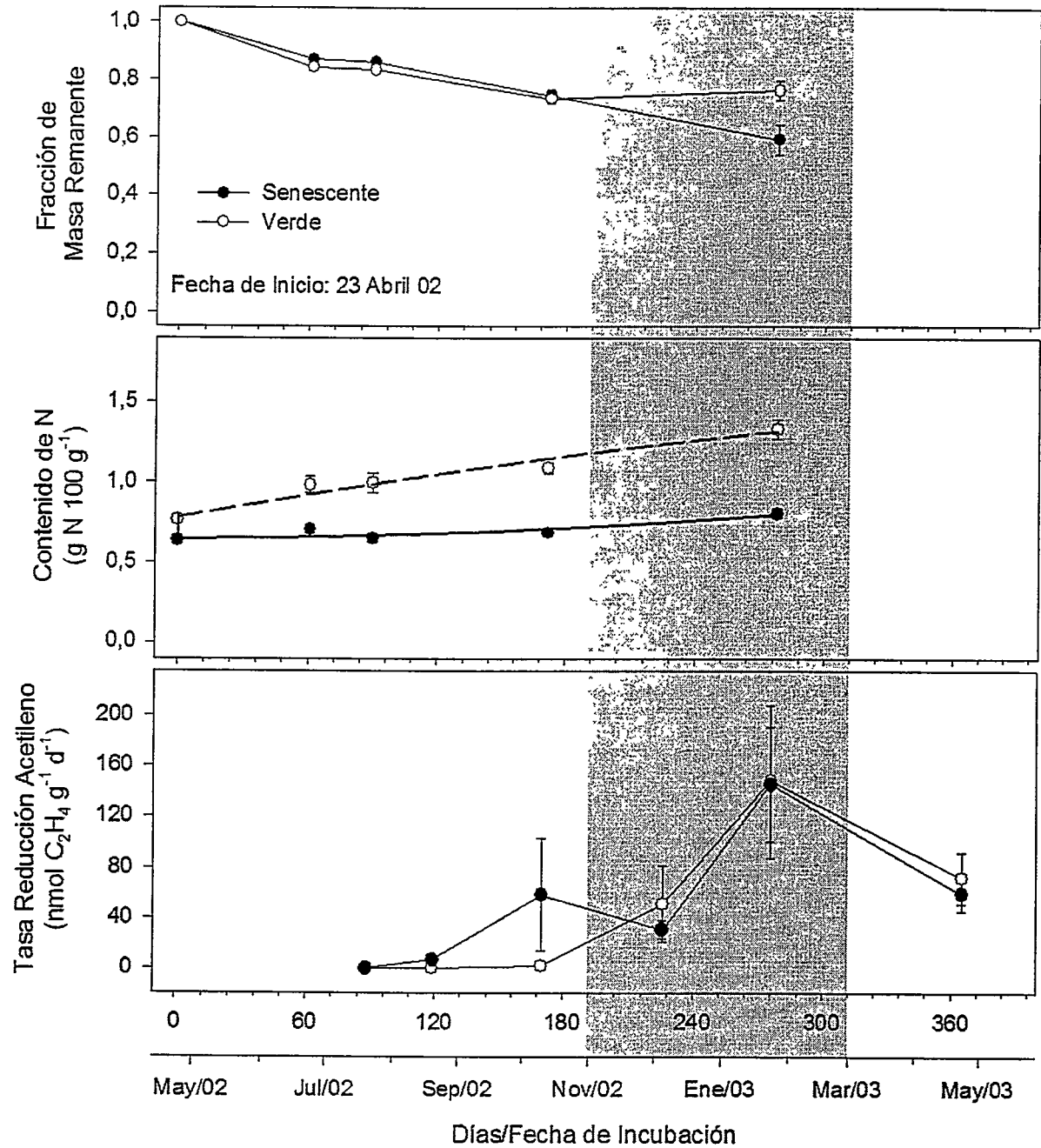
Drimys winteri

Figura 17
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 17

Experimento conjunto de fijación de N_2 (reducción de acetileno) y descomposición *in situ* de muestras de hojarasca verde y senescente de *Drimys winteri*. Las muestras fueron colocadas en el sitio de estudio de la Estación Biológica senda Darwin, Chiloé, dentro de bolsas de malla de 2 mm (tamaño de poro) el 23 de Abril de 2002. Gráfico superior: dinámica de pérdida de masa. Los puntos corresponden a promedios de fracción de masa remanente \pm EE ($n = 6$). Se indica curva de ajuste exponencial negativo. Gráfico intermedio: dinámica del contenido de N total del detritus. Puntos corresponden a promedios \pm EE ($n = 3$). Se muestra curvas de ajuste exponencial. Gráfico inferior: dinámica de tasa de reducción de acetileno. Los puntos corresponden a promedios \pm EE ($n = 5 - 6$), y están unidos por rectas. Áreas sombradas indican estación de crecimiento.

Tabla 8.- Resultados de análisis de varianza con medidas repetidas del experimento de descomposición y fijación de N₂ de hojarasca verde y senescente de *N. nitida* y *D. winteri*. Factor entre sujetos: Tipo, dos niveles = Senescente vs. Verde; factor dentro de sujetos: Tiempo (fechas de muestreo). TRA *in situ* y de laboratorio fueron transformadas a logaritmo natural.

Especie	Variable Dependiente	Fuente de Variación	F	P
<i>N. nitida</i>	Fracción de Masa Remanente	Tipo	$F_{(1, 10)} = 4,573$	0,0582
		Tiempo	$F_{(4, 40)} = 68,590$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(4, 40)} = 1,728$	0,163
	TRA <i>in situ</i>	Tipo	$F_{(1, 6)} = 2,603$	0,158
		Tiempo	$F_{(7, 42)} = 7,501$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(7, 42)} = 1,418$	0,224
	TRA Laboratorio	Tipo	$F_{(1, 9)} = 0,143$	0,714
		Tiempo	$F_{(3, 27)} = 2,695$	0,066
		Tipo x Tiempo	$F_{(3, 27)} = 0,150$	0,929
	Contenido N Total	Tipo	$F_{(1, 4)} = 312,392$	< 0,001
		Tiempo	$F_{(3, 12)} = 39,498$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(3, 12)} = 5,250$	0,015
<i>D. winteri</i>	Fracción de Masa Remanente	Tipo	$F_{(1, 8)} = 0,855$	0,382
		Tiempo	$F_{(3, 24)} = 20,546$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(3, 24)} = 7,150$	0,001
	TRA <i>In situ</i>	Tipo	$F_{(1, 10)} = 3,403$	0,095
		Tiempo	$F_{(5, 50)} = 37,126$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(5, 50)} = 0,938$	0,464
	TRA Laboratorio	Tipo	$F_{(1, 9)} = 2,183$	0,174
		Tiempo	$F_{(3, 27)} = 14,408$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(3, 27)} = 0,189$	0,903
	Contenido N Total	Tipo	$F_{(1, 4)} = 841,050$	< 0,001
		Tiempo	$F_{(3, 12)} = 13,135$	< 0,001
		Tipo x Tiempo	$F_{(3, 12)} = 2,903$	0,079

Tabla 9.- Pendientes de la TRA en función del tiempo de descomposición (tendencia de la FNS en el tiempo). Estimaciones de bootstrap y error estándar. Entre paréntesis se indica la probabilidad de una cola de prueba de aleatorización para la significancia de la pendiente. En las últimas dos columnas se presentan las probabilidades de una y dos colas de la prueba de aleatorización para comparar las pendientes de hojarasca verde y senescente de cada especie por separado.

Especie	Troncos	Hojarasca		Probabilidad Prueba Aleatorización Hojarasca Senescente vs. Verde	
		Senescente	Verde	1-cola	2-colas
<i>N. nítida</i>	0,0101 ± 0,0029 (P _{1-cola} = 0,0075)	0,0630 ± 0,0092 (P _{1-cola} = 0,0010)	0,0606 ± 0,0089 (P _{1-cola} = 0,0005)	0,3715	0,7240
<i>D. winteri</i>	-	0,3264 ± 0,1053 (P _{1-cola} = 0,0095)	0,4259 ± 0,1198 (P _{1-cola} = 0,0035)	0,7815	0,4265

Tabla 10.- Comparación de modelos de regresión de fracción de masa remanente y contenido total de N en función del tiempo transcurrido de descomposición de hojarasca de *N. nitida* y *D. winteri*. Modelos de regresión: Lineal: $y = a + k \cdot t$; Decaimiento Exponencial: $y = a \cdot e^{-k \cdot t}$; Cuadrático: $y = a + k \cdot t + b \cdot t^2$; y = variable dependiente; t = tiempo; a , k , b : parámetros. Parámetros con asterisco (*) son estadísticamente significativos (Prueba t, $P < 0,05$).

Variable Dependiente	Especie Hojarasca	Tipo de Modelo de Regresión	Parámetros			Estadísticos de Regresión				
			a	k	b	F _(n,d)	n	d	P	R ²
Fracción de Masa Remanente	<i>D. winteri</i>	Senescente	0,9882*	0,0018*	-	65,439	1	23	< 0,001	0,740
		Lineal	0,9641*	-0,0013*	-	68,030	1	23	< 0,001	0,747
	Verde	D. Exponencial	0,8607*	0,0006*	-	10,635	1	20	0,004	0,347
		Lineal	0,8562*	-0,0004*	-	10,237	1	20	0,005	0,339
Contenido Total de N	<i>N. nitida</i>	Senescente	1,0062*	0,0014*	-	135,422	1	34	< 0,001	0,799
		Lineal	0,9817*	-0,0011*	-	148,555	1	34	< 0,001	0,814
	Verde	D. Exponencial	0,9776*	0,0014*	-	289,464	1	34	< 0,001	0,895
		Lineal	0,9471*	-0,0010*	-	260,535	1	34	< 0,001	0,885
<i>D. winteri</i>	Senescente	Lineal	0,6316*	0,0005*	-	24,050	1	16	< 0,001	0,601
		Cuadrático	0,6439*	0,0001	0,0000	13,608	2	15	< 0,001	0,645
	Verde	Lineal	0,7910*	0,0020*	-	110,903	1	16	< 0,001	0,874
		Cuadrático	0,7779*	0,0025*	0,0000	54,663	2	15	< 0,001	0,879
<i>N. nitida</i>	Senescente	Lineal	0,6823*	0,0008*	-	41,135	1	16	< 0,001	0,720
		Cuadrático	0,7060*	0,0001	0,0000	27,371	2	15	< 0,001	0,785
	Verde	Lineal	0,9201*	0,0021*	-	254,965	1	16	< 0,001	0,941
		Cuadrático	0,9373*	0,0016*	0,0000	137,402	2	15	< 0,001	0,948

Tabla 11.- Estimación de bootstrap de las constantes de descomposición por modelo de decaimiento exponencial de la masa remanente de hojarasca y probabilidad de dos colas de prueba de aleatorización de las diferencias entre k (ver sección II.10.3). Las estimaciones corresponden a promedios de bootstrap \pm EE e intervalo de confianza del 95% entre paréntesis.

Especie	k (x 10 ³ d ⁻¹)		P 2-colas
	Hojas Senescentes	Hojas Verdes	
<i>N. nitida</i>	1,382 \pm 0,190 (1,036 – 1,775)	1,430 \pm 0,116 (1,199 – 1,657)	0,792
<i>D. winteri</i>	1,769 \pm 0,326 (1,102 – 2,356)	0,589 \pm 0,217 (0,183 – 1,027)	0,016

Tabla 12.- Estimación de la reducción acumulada de acetileno (RAA) por método de área bajo la curva (polígono) de TRA versus tiempo de descomposición para cada sustrato estudiado. Se indica el período total observado en cada caso, y las RAA correspondientes al período total y a 365 días. Los valores corresponden a estimaciones de bootstrap \pm EE e intervalo de confianza del 95% entre paréntesis.

Especie	Sustrato	Período (días)	RAA (nmol C ₂ H ₄ g ⁻¹)	
			Período Total	365 días
<i>N. nitida</i>	Residuos Leñosos	435	1659,6 \pm 295,7 (1158,1 – 2282,4)	886,5 \pm 128,2 (652,5-1157,2)
	Hojarasca Senescente	449	5187,0 \pm 677,6 (4001,3 – 6656,1)	3024,4 \pm 629,1 (1930,5 – 4374,9)
	Hojarasca Verde	449	3971,8 \pm 387,1 (3235,4 – 4754,5)	1998,0 \pm 277,5 (1484,4 – 2570,3)
<i>D. winteri</i>	Hojarasca Senescente	365	17669,7 \pm 3596,0 (11146,5 – 25055,9)	17669,7 \pm 3596,0 (11146,5 – 25055,9)
	Hojarasca Verde	365	16219,1 \pm 4160,0 (8603,1 – 24917,8)	16219,1 \pm 4160,0 (8603,1 – 24917,8)

II.5. Discusión

La íntima relación entre los procesos de fijación biológica de N_2 y descomposición de la materia orgánica se vio revelada en los resultados de los experimentos de descomposición *in situ*. Tanto en el material leñoso como en la hojarasca se observó un progresivo aumento de la actividad diazotrófica a medida que transcurrió la descomposición, siguiendo la fluctuación estacional. En el caso del material leñoso, se apoyó parcialmente la hipótesis propuesta de que la fijación de N_2 es máxima durante las primeras etapas de la descomposición, ya que sólo se observó una fracción muy pequeña del período inicial de descomposición, no pudiendo asegurar que la actividad de reducción de acetileno continúe aumentando en los años siguientes (Figura 15).

Material foliar

La mayor reducción acumulada de acetileno observada durante la descomposición de hojas senescentes de *N. nitida* y *D. winteri*, con respecto a las hojas verdes (Tabla 12) fue congruente con la hipótesis propuesta de que los sustratos deficientes en N (con alta C/N) presentan una mayor actividad diazotrófica durante las primeras etapas de su descomposición. Sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, como tampoco lo fueron las diferencias entre pendientes de la TRA vs. tiempo de ambos tipos de sustrato (Tablas 9 y 12). Al respecto, cabe señalar que, a pesar del desfase temporal de los experimentos de descomposición de hojarasca de las dos especies consideradas, la actividad de fijación de N_2 fue bastante mayor en *D. winteri* que en la de *N. nitida*, siendo la primera más pobre en N que la segunda. Sin embargo, las diferencias de contenido inicial de N fueron mayores entre hojas verdes y senescentes que entre hojas de especies distintas, al menos para el caso de hojas senescentes (Tabla 7). De esto se deduce que la intensidad de la respuesta de la actividad diazotrófica frente a la calidad

química de la hojarasca depende de la especie, y no solamente del contenido inicial de N.

Por otra parte, la TRA fue bastante variable en el tiempo y espacio, pero no difirió significativamente entre hojas verdes y senescentes post abscisión para ninguna de las especies (Tabla 8). Sin embargo, se observó una acumulación sostenida de N en el tiempo en todos los sustratos, y no solamente en aquellos con menor contenido inicial de N. Los resultados de este experimento fueron menos claros que lo observado por Thompson & Vitousek (1997) en hojarasca de bosques tropicales de Hawai, en donde la fijación no-simbiótica de N_2 fue mayor en sustratos pobres en N.

La comparación entre hojas verdes y senescentes (post abscisión) de una misma especie tuvo la ventaja de anular el efecto de las diferencias en estructura foliar u otras propiedades biológicas y químicas que pudieran existir entre hojas de especies distintas, ayudando a aislar el efecto del contenido inicial de N del sustrato sobre el desempeño de las poblaciones de diazotrofos que lo colonizan. Al respecto, cabe destacar que tampoco se observó un claro efecto del tipo de sustrato sobre la pérdida de masa seca en *N. nitida* y *D. winteri* (Tabla 8). En *D. winteri* se observaron diferencias significativas entre las constantes de descomposición de hojas verdes y senescentes, pero no en *N. nitida* (Tabla 11). Con éstos resultados se cuestionó la afirmación general de que el contenido inicial de N es un buen predictor de la tasa de descomposición (Chapin et al. 2002). Smith & Bradford (2003) observaron que la descomposición de hojarasca de pastos de una misma especie que diferían en sus contenidos iniciales de N no presentó diferencias significativas. De hecho, el N orgánico contenido en el detritus no es una forma inmediatamente disponible para los microorganismos. Por otra parte, Hobbie (2000) encontró que la respuesta de la tasa de descomposición frente a la disponibilidad de N depende de la calidad química del carbono del detritus, es decir, de su

contenido de compuestos recalcitrantes como la lignina (a menor contenido de compuestos recalcitrantes, mayor calidad).

En los ensayos de reducción de acetileno *in situ* y laboratorio realizados con muestras de hojarasca colectadas en verano en el sitio de estudio del Parque Nacional Chiloé (Capítulo III) se determinó una asociación positiva entre el contenido total de N y la tasa de fijación de N₂. Sin embargo, la hojarasca utilizada en estos ensayos corresponde a una mezcla compleja de sustratos que pertenecen a distintas especies y tipos de estructuras y que, además, difieren en su tiempo de permanencia en la detritósfera. La detritósfera recibe un continuo aporte de material fresco desde el dosel, por lo tanto en ella existen muchas "cohortes de hojarasca" ("litter cohorts", Ågren & Bosatta 1996) en distintas etapas de su descomposición. Por lo tanto, no es lo mismo comparar el comportamiento de la actividad diazotrófica en sustratos con un mismo tipo de estructura, misma especie y mismo estado de descomposición, como en el caso de hojas verdes y senescentes de *N. nitida* y *D. winteri*, que comparar la actividad diazotrófica en mezclas complejas de sustratos, en donde la superposición de múltiples factores puede afectar el desempeño de los diazótrofos (ver Capítulo III).

Material leñoso

Con respecto al material leñoso, a pesar de ser un material pobre en N, en él se registró una reducción acumulada mucho menor (Tabla 12), lo cual indica que existiría otro tipo de control de la fijación de N₂ en este sustrato, probablemente relacionado con la disponibilidad de carbono lábil y la accesibilidad para la colonización por parte de los diazótrofos (Harmon et al. 1986, Hicks et al. 2003). La ausencia de diferencias de TRA entre las distintas clases de descomposición de troncos caídos de grueso calibre (Capítulo I, Figura 11) no es congruente con la hipótesis de que existen cambios en la dinámica de la fijación durante la descomposición del detritus. Probablemente

los cambios de actividad diazotrófica son menos evidentes en estos substratos voluminosos y en general resistentes a la colonización microbiana. Este resultado también se contrapone con los hallazgos de Hicks et al. 2003 en bosques de la costa pacífica del noroeste de USA, quienes encontraron una mayor actividad diazotrófica en troncos de estado de descomposición intermedio (clase III) de descomposición,

Tiempo de descomposición

En los experimentos de descomposición y fijación de N_2 *in situ* realizados en esta tesis se demostró que el tiempo transcurrido desde la deposición inicial de los substratos frescos en la detritósfera es otra variable que afecta la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 , y que podría explicar parte de la variación espacial de este proceso observada en la hojarasca del bosque Nordpatagónico estudiado (Capítulo I, Apéndice A). Este bosque está dominado por especies arbóreas siempreverdes que, a diferencia de lo que ocurre en bosques deciduos, aportan material vegetal fresco al suelo durante todo el año (superposición de "cohortes de hojarasca") (Pérez et al. 2003), produciendo una heterogeneidad espacial de estados o tiempos de descomposición de los substratos presentes en la detritósfera y contribuyendo a explicar las diferencias en la actividad diazotrófica documentadas en esta tesis.

CAPÍTULO III

REGULACIÓN DE LA FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N₂ EN LA DETRITÓSFERA

Vitousek et al. (2002) propusieron un esquema jerárquico para ordenar las variables que potencialmente puede afectar la fijación biológica de nitrógeno (simbiótica y no simbiótica). Este esquema considera al nivel ecosistémico como nivel focal, en el cual se encuentran las influencias o controles ecológicos, es decir, aquellos factores cuya variación a la escala de interés afecta la actividad diazotrófica. A nivel infra-ecosistémico se encuentran los controles fisiológicos, celulares y moleculares del proceso. A nivel supra-ecosistémico, esto es regional o global, están las variables que restringen o limitan la actividad diazotrófica, principalmente determinadas por el clima (Grimm & Petrone 1997).

Aplicando este esquema a la fijación no-simbiótica en la detritósfera de un bosque templado (Figura 18), los controles ecológicos corresponden a características físico-químicas y biológicas locales del substrato orgánico en el que se desarrollan las poblaciones de diazótrofos, tales como el contenido total de N y C, variables micro climáticas a nivel de la capa de hojarasca (e.g. temperatura superficial del suelo, contenido hídrico e iluminación) y la composición biológica del detritus vegetal, que depende a su vez de la composición florística del bosque (Figura 18). A nivel celular o molecular están los factores que afectan la biosíntesis y actividad enzimática, ya mencionados en la Introducción General. Entre ellos se destaca la concentración de NID en el

medio extracelular o solución que embebe a la detritósfera (Zuberer 1998) (Figura 3).

Es este capítulo se investigó el efecto de todas las variables mencionadas en la Figura 18 como controles ecológicos y bioquímicos de la FNS en la detritósfera del bosque Nordpatagónico mediante experimentos de laboratorio y un análisis exploratorio de la variabilidad (espacial) conjunta de la naturaleza química y biológica del detritus y su actividad diazotrófica.

III.1. Hipótesis de trabajo

Hipótesis 1.

El contenido de NID ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) en el detritus orgánico ejerce un efecto negativo sobre la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 (control a nivel molecular y celular) y la adición de NID en niveles comparables a la deposición húmeda de N en sitios contaminados produce la inhibición de la actividad diazotrófica en la hojarasca.

Hipótesis 2.

Se postula que las siguientes características del detritus actúan como controles ecológicos del proceso de fijación no-simbiótica de N_2 en la detritósfera y explican su variación espacial en el interior del bosque templado:

- a) Temperatura.
- b) Iluminación.
- c) Contenido hídrico del detritus.
- d) Contenido de N y C total del detritus.
- e) Composición del detritus (especies y tipo de tejido vegetal).

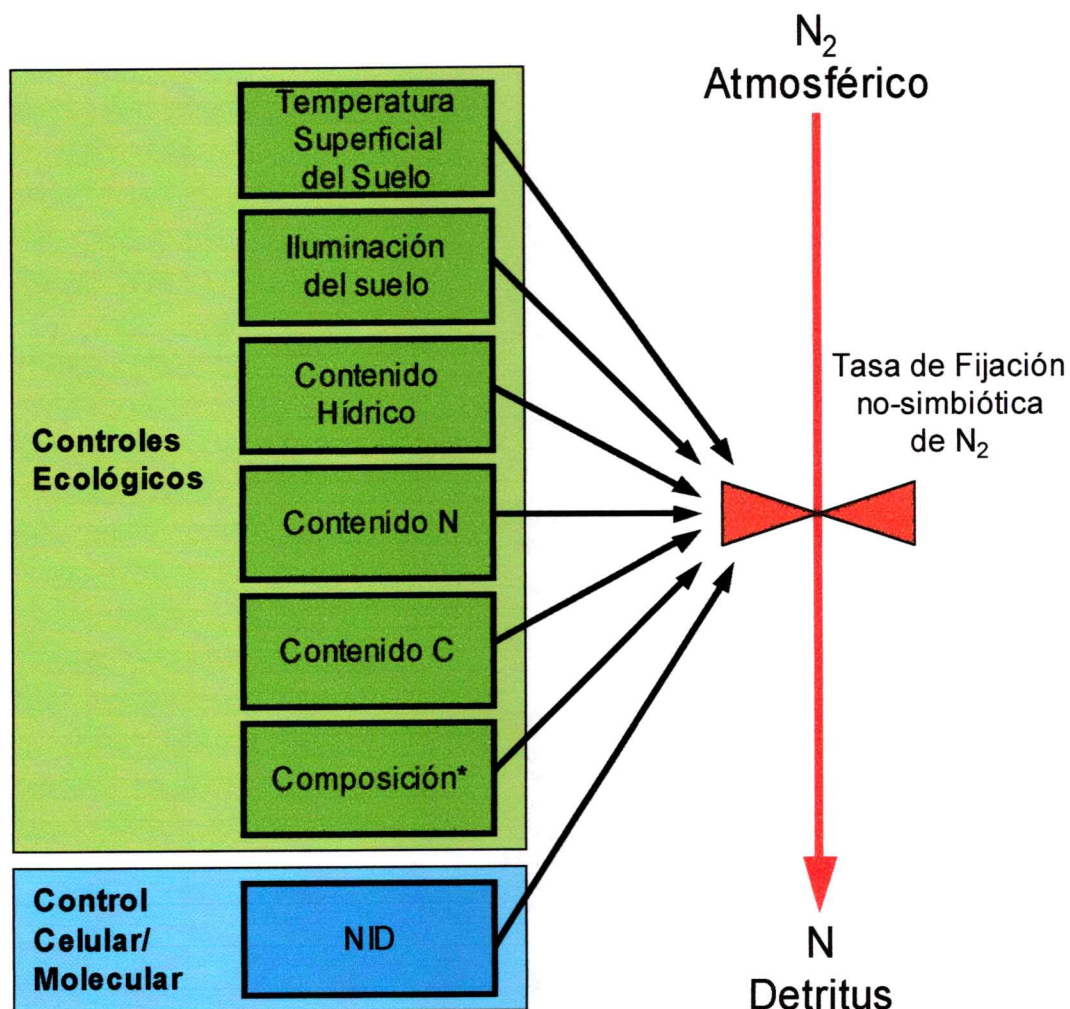


Figura 18

Controles de la fijación no simbiótica de N_2 en la detritósfera de bosques templados, cuyos efectos se estudiaron en esta tesis. Los controles corresponden a variables que afectan la tasa de fijación de N_2 a nivel celular o molecular y a nivel ecológico. Algunos controles abióticos están condicionados o restringidos por variables abióticas externas cuya dinámica se da a nivel regional. Diagrama inspirado en la Figura 1 de Vitusek et al. (2002). *Composición de la hojarasca: abundancia relativa de material leñoso y foliar de distintas especies; NID: nitrógeno inorgánico disuelto.

III.2. Objetivos Específicos

Objetivo 1

Determinar, mediante experimentos de laboratorio, el efecto de las siguientes variables sobre la tasa de fijación no-simbiótica de N₂ en la hojarasca:

- f) Contenido de N inorgánico disuelto en el detritus orgánico.
- g) Temperatura.
- h) Iluminación.
- i) Contenido hídrico del detritus orgánico.

Objetivo 2

Describir, mediante análisis multivariados, la variabilidad conjunta de la tasa de fijación no-simbiótica de N₂ en la hojarasca y las siguientes variables del detritus:

- a) Contenido de N y C total.
- b) Composición del detritus orgánico (especies y tipo de tejido vegetal)

III.3. Materiales y métodos

III.3.1. Efecto de variables abióticas

Junto con las observaciones *in situ* de la covariación temporal de variables abióticas y la TRA (Capítulo I, sección I.3.1), se realizaron una serie de experimentos manipulativos de laboratorio para determinar el efecto de cada variable abiótica considerada en esta tesis sobre la actividad de los diazótrofos de vida libre de la hojarasca (objetivo específico 1). Todos los experimentos realizados tuvieron en común el siguiente protocolo básico: se recolectó material fresco de los bosques del Parque Nacional Chiloé o de la Estación

Biológica "Senda Darwin" (ver Introducción general) el que fue transportado en caja térmica y frío dentro de bolsas de plástico herméticas al laboratorio de Sistemática y Ecología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en donde fueron mantenidas en un refrigerador a 4 °C hasta su utilización. Todo el material fue depositado dentro de una caja plástica previamente limpiada con alcohol metílico y se mezcló manualmente utilizando guantes de goma para producir la máxima homogenización posible. Se colocó un volumen aproximadamente constante de hojarasca, equivalente a un rango de 11 a 26 g secos, dentro de los frascos de incubación para realizar los ensayos de reducción de acetileno. Los frascos fueron preincubados por una hora a 20 °C y después se aplicó el correspondiente tratamiento experimental antes de la inyección de acetileno. La incubación fue realizada en una cámara termo regulada provista de iluminación interna (tubos fluorescentes) y se tomaron muestras de gas de cada frasco al inicio y al final del período total de incubación (48 h). Todas las incubaciones se realizaron en oscuridad, salvo el experimento del efecto de la iluminación.

En forma complementaria a estos experimentos se analizó la variación espacial conjunta de la TRA y las variables abióticas en el ensayo in situ de Enero 2001.

Nitrógeno inorgánico disuelto

Se simularon eventos de deposición húmeda de nitrato y amonio sobre la hojarasca, con niveles similares o mayores que los registrados en bosques templados del Hemisferio Norte sometidos al impacto de la contaminación industrial (ver Introducción general). Las muestras de hojarasca fueron colocadas dentro de los frascos de incubación y se rociaron con 20 ml de solución de NH_4NO_3 (Merk®) de concentración variable (ver más abajo), y utilizando agua desionizada como control. Se utilizó este compuesto debido a que sólo contiene N inorgánico, con lo que se evita la adición de otro nutriente

que pueda confundir el efecto del NID (Eviner et al. 2000). La solución fue aplicada con una pipeta de vidrio en forma homogénea sobre la muestra, simulando un evento de precipitación. El volumen agregado es equivalente a un evento discreto de lluvia de 0,5 mm en el campo ($0,5 \text{ l m}^{-2}$), considerando la masa promedio de muestra dentro del frasco y su abundancia natural por unidad de superficie ($0,45 \text{ Kg m}^{-2}$; Capítulo I, Tabla 5). Esta cantidad fue suficiente para producir una evidente humectación de la hojarasca, y lo suficientemente pequeña para evitar la acumulación de líquido en la base de los frascos.

Se realizaron dos experimentos independientes de adición de NID en Noviembre del 2001. En el primer experimento (Experimento A), se aplicó un solo nivel de concentración de NH_4NO_3 de 0,1 mM a un grupo de 15 muestras. Otro grupo de 15 muestras sirvió como control (adición de agua desionizada, 0 mM). El nivel de concentración de NID aplicado es muy superior al observado en el agua de neblina del sitio de estudio (0,001 mM; Weathers et al. 2000), y correspondió proporcionalmente a una deposición atmosférica de NID de $0,2 \text{ Kg N ha}^{-1}$. Este evento de deposición de NID es muy superior al experimentado por los bosques del Parque Nacional Chiloé, ya que estos reciben ca. $0,8 \text{ Kg N ha}^{-1}$ durante un año (Hedín et al. datos no publicados, Introducción general). En el segundo experimento (Experimento B), se aplicaron cinco niveles crecientes de concentración, incluyendo el control, a grupos de 8 muestras: 0, 1, 10, 100 y 1000 mM (progresión logarítmica). Después de aplicar los tratamientos, las muestras se sometieron al ensayo de reducción de acetileno a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para determinar la actividad de reducción de acetileno (sección II.2). Los frascos correspondientes los distintos tratamientos fueron mezclados y distribuidos al azar dentro de la cámara de incubación. Al final de la incubación (48 h) se midió la masa fresca de las muestras, estas fueron secadas en estufa a 70°C por 72 horas y se determinó su masa seca y contenido hídrico. En un subconjunto escogido al azar de cuatro muestras por cada nivel de adición de NID del

experimento B se determinó su contenido de nitrato (NH_4^+) y amonio (NO_3^-) disponible, descrito a continuación. También se calculó la cantidad de NID agregada por unidad de masa seca a las muestras de cada tratamiento.

Determinación de NID en la hojarasca

Se siguió el siguiente protocolo: de cada muestra se tomó una submuestra de 10 g de peso fresco que fue colocada en un frasco de plástico. A continuación se agregó 80 ml de solución extractante de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ al 1% (razón de mezcla 1:8 masa : volumen) y se agitó por 20 min, para extraer todo el NO_3^- y NH_4^+ de intercambio (NID). La suspensión líquida resultante fue filtrada con papel filtro (Nº 40, Whatman®) y almacenada a 4 °C hasta ser sometida al procedimiento de destilación fraccionada de Kjeldahl (Black et al. 1965, Pérez et al. 1998). El contenido de NID de la hojarasca fue expresado como miligramos de N (como NO_3^- y NH_4^+) por gramo seco de hojarasca, o por mililitro de agua contenida en la hojarasca (la cantidad de agua contenida en la muestra de hojarasca fue estimada gravimétricamente).

Temperatura

Se realizaron ensayos sucesivos de reducción de acetileno bajo cinco niveles de temperatura, abarcando un rango de 7,0 a 31,5 °C. Las incubaciones fueron realizadas en una misma cámara de incubación y en oscuridad durante Octubre del 2002. Para cada temperatura se incubó un grupo de 10 muestras, excepto para 31,5 °C en donde se utilizaron 7 muestras.

Iluminación

Se comparó la TRA de 10 muestras incubadas en frascos envueltos en papel de aluminio (tratamiento de oscuridad) con la de 10 muestras en frascos sin envolver (tratamiento de exposición a la luz). La incubación se realizó en

Octubre del 2002 dentro de una cámara a temperatura constante de 20 °C iluminada con tubos fluorescentes (> 2000 Lux de iluminación).

Contenido hídrico

Se realizaron dos experimentos en el laboratorio independientes para determinar el efecto de la adición de un volumen variable de agua desionizada (hidratación) a muestras de hojarasca, previamente secada al aire, sobre la tasa de fijación no-simbiótica de N₂. En el primer experimento (Experimento A), realizado en Noviembre del 2002, el secado fue realizado en el laboratorio durante una semana, se colocaron las muestras dentro de los frascos de incubación y se aplicaron tres niveles de adición de agua y un control sin humedecer: 0 (control), 5, 10 y 15 ml. En el segundo experimento (Experimento B), realizado en Diciembre del 2002, se utilizó hojarasca fresca colectada después de un periodo prolongado de sequía (ca. 20 días sin lluvia) en el bosque de la Estación Biológica "Senda Darwin" (secado *in situ*), y se aplicaron tres niveles de adición de agua y un control sin humedecer: 0 (control), 5, 10 y 20 ml. La adición de agua fue realizada con una pipeta de vidrio en forma homogénea sobre la muestra, y cada volumen de adición fue aplicado a un grupo de cinco muestras (frascos). Al final de los experimentos las muestras fueron secadas en estufa a 70°C por 72 h para determinar su masa seca y contenido hídrico (gravimetría).

III.3.2. Efecto de variables del detritus

Se investigó la influencia de la naturaleza química y biológica del detritus vegetal sobre la fijación no-simbiótica de N₂ (estimada por la TRA) de acuerdo con el objetivo específico 2, mediante el análisis de la variabilidad (espacial) conjunta de estas variables en el ensayo *in situ* de Enero 2001 y de laboratorio de Febrero 2002.

Composición química (C y N) de la hojarasca

Las muestras secas de hojarasca se trituraron con un molino manual y después el material triturado fue pulverizado con un molino eléctrico. Finalmente, una submuestra de 8 a 13 mg fue analizada por el método de combustión instantánea en un analizador automático de elementos Carlo Erba (NA 2500), en cual entrega los datos en porcentaje de cada elemento con respecto a la masa seca (o bien, g C ó N 100 g⁻¹).

Debido a que la hojarasca es un material muy heterogéneo (mucho más que el suelo subyacente), el proceso de triturado y posterior pulverizado de las muestras maximizó la homogenización de las mismas, aumentando la probabilidad de que la submuestra analizada fuera representativa de toda la muestra original. En el caso del ensayo *in situ* de Febrero 2002, las muestras fueron separadas en sus componentes (ver sección II.8.3). Para el análisis químico, todos los componentes se volvieron a juntar para la trituración y pulverizado, de tal manera que los valores resultantes de contenido de C y N fueran representativos de toda la muestra de hojarasca y no de sus componentes por separado.

Composición biológica de la hojarasca

Se determinó la composición de las muestras de hojarasca del ensayo de laboratorio realizado en Febrero 2002. Estas muestras fueron colectadas al azar en la grilla experimental del sitio del Parque Nacional Chiloé (ver Capítulo I, sección I.3.1). Las muestras secas fueron inspeccionadas visualmente, separando manualmente todas las estructuras (componentes biológicos) reconocibles: material foliar de las distintas especies, material leñoso fino (diámetro < 1 cm), y material fragmentado e indeterminado (también se incluyó en este último las semillas, musgos, hepáticas, helechos y restos animales). Las muestras separadas fueron vueltas a secar en estufa a 70 °C por 72 h y se determinó la masa seca de cada componente. La composición de la hojarasca

fue caracterizada como el promedio de la abundancia relativa de cada componente con respecto a la masa total.

III.3.3. Análisis estadístico

Variables abióticas

En todos los experimentos se consideró a la tasa de reducción de acetileno transformada a logaritmo natural $[\ln(1+TRA)]$ como variable dependiente. Se utilizó esta transformación para cumplir con el supuesto paramétrico de distribución normal.

NID

Los resultados de los experimentos A y B fueron analizados a través de análisis de varianza de una vía, considerando a los niveles de adición de NID como único factor. Se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey para determinar las diferencias entre tratamientos cuando hubo efecto significativo de la adicción de NID. Estos análisis fueron realizados en el programa STATISTICA (versión 5.5, StatSoft, Inc. 2000). La relación entre el contenido de NID de la hojarasca y TRA fue sometida a análisis de regresión utilizando un modelo lineal y exponencial usando el programa SigmaPlot.

Temperatura e iluminación

Los datos de las incubaciones a distintas temperaturas se analizaron mediante análisis de varianza de una vía con el nivel de temperatura como único factor y prueba *a posteriori* de Tukey (programa STATISTICA). Además se realizó un análisis de regresión no lineal de la relación entre TRA y Temperatura, utilizando los modelos Cuadrático y Gaussiano (programa SigmaPlot). Se realizaron estimaciones de bootstrap de los respectivos

parámetros, siguiendo el mismo procedimiento explicado en el Capítulo I (sección I.3.2, ajuste sinusoidal de TRA *in situ* vs. tiempo).

El experimento de iluminación se analizó utilizando la prueba de t para la comparación entre tratamientos (luz y oscuridad).

Contenido Hídrico

Se aplicó un análisis de varianza de una vía para comparar las TRA de los distintos niveles de adición de agua de cada experimento (A y B). Además, se realizó un análisis de regresión lineal sobre los datos de TRA en función del contenido hídrico efectivo de las muestras de cada experimento.

Análisis de la variabilidad conjunta de variables abióticas y químicas

De acuerdo con el Objetivo Específico 2 se realizó un análisis de regresión múltiple considerando la TRA como variable independiente y la iluminación incidente, la temperatura superficial del suelo, el contenido hídrico y el contenido total de N y C como variables independientes. Se utilizaron los datos de los ensayos de Enero del 2001 (*in situ*) y Febrero del 2002 (laboratorio; en este análisis no se incluyó temperatura ni iluminación). En ambos ensayos, la unidad de muestreo fue una muestra de hojarasca colectada en un punto de la grilla experimental del Parque Nacional Chiloé (Capítulo I). Todas las variables fueron estandarizadas.

En forma complementaria, se utilizó la prueba de Mantel (Manly 1997) para evaluar la asociación estadística (correlación) entre la matriz de diferencias de TRA entre muestras (**T**) y la matrices de diferencias de iluminación (**L**), contenido hídrico (**CH**), y contenido total de N (**N**) entre muestras. Estas matrices fueron calculadas utilizando ecuaciones análogas a la Ecuación 3 (Capítulo I, sección I.3.2). Se calculó la probabilidad de una y dos colas de la

prueba. Este procedimiento fue realizado con el programa PopTools (Hood 2000).

Composición biológica

La variabilidad de la composición de la hojarasca fue resumida a través de un análisis de componentes principales (ACP), basado en la matriz de correlación de las abundancias relativas de los componentes de las muestras de hojarasca del ensayo de laboratorio de Febrero 2002. La significancia estadística de la proporción de varianza explicada y de los coeficientes (loadings) de las variables originales (abundancias relativas de componentes) correspondientes a los dos primeros componentes, fue evaluada mediante un procedimiento de aleatorización propuesto por McGarigal et al. (2000). Según este método, los datos de abundancia relativa de cada componente se reasignaron estocásticamente 2000 veces, y los valores observados fueron comparados con la distribución de pseudovalores resultante, determinando la significancia estadística con un nivel del 5% (prueba bilateral).

Posteriormente se utilizaron los dos primeros componentes principales como estimadores integrados de la composición del detritus, y se realizó un análisis de regresión múltiple considerando a los valores (scores) de ambos componentes como variables independientes y la tasa de reducción de acetileno de laboratorio (20 °C) como variable dependiente. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre la TRA y el segundo componente, determinando su significancia estadística mediante una prueba de aleatorización (remuestreo sin reposición de datos de TRA, recálculo de r y estimación de la probabilidad bilateral, utilizando programa PopTools).

La asociación entre la composición y la fijación de N_2 de la hojarasca también se evaluó mediante la prueba de Mantel. Para ello se calculó la matriz

de distancias Euclidianas de composición entre muestras, **D**, utilizando la siguiente expresión (Manly 1994):

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (c_{ik} - c_{jk})^2}$$

Ecuación 6

donde d_{ij} es la distancia Euclidea entre la muestra i y la muestra j , c_{ik} y c_{jk} son las abundancias relativas correspondientes al componente k de la hojarasca en la muestra i y en la muestra j , respectivamente, y p es el número total de componentes reconocidos en la hojarasca. d_{ij} es una medida de cuán distintas son dos muestras de hojarasca con respecto a su composición biológica. Con la prueba de Mantel se evaluó la asociación entre **D** y la matriz de diferencias de tasas de reducción de acetileno entre muestras, **T** (Ecuación 3, Capítulo I).

Relación entre composición biológica y variables del detritus

De acuerdo con el Objetivo Específico 2, se realizaron dos análisis multivariados para evaluar el efecto integrado de la composición biológica de la hojarasca sobre el conjunto de variables del detritus consideradas en el ensayo de laboratorio de Febrero 2002: tasa de reducción de acetileno, contenido total de C y N, relación C:N y contenido hídrico. Primero se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) sobre las variables mencionadas (estandarizadas), y se estimó el coeficiente de correlación de Pearson entre la abundancia relativa de los componentes más abundantes de la hojarasca y los dos primeros ejes de ordenación. La significancia de los coeficientes y varianzas explicadas de los dos primeros ejes de ordenación fueron evaluadas mediante aleatorización de variables (reasignación estocástica de variables en las muestras), según lo sugerido por McGarigal et al. (2000). La significancia de las correlaciones entre ejes y componentes de la hojarasca fue evaluada por prueba de aleatorización (reasignación estocástica de valores de ejes en muestras).

El segundo procedimiento realizado fue un **Análisis de Redundancia** (AR) (Ter Braak 1994, Ter Braak & Prentice 1988, Ter Braak & Looman 1994). Este análisis combina la regresión múltiple y la ordenación de componentes principales (Ter Braak & Looman 1994), y produce un diagrama que resume gráficamente las relaciones entre un conjunto de variables independientes o predictoras y otro conjunto de variables dependientes o respuesta (Ter Braak 1994). Los ejes de ordenación son una combinación lineal de las variables independientes. El modelo subyacente supone una relación lineal entre cada variable dependiente y cada variable independiente. La significancia de los valores propios (varianzas) asociados a cada eje se evalúa por medio de una prueba de permutación de Monte Carlo (ver Verdonschot & Ter Braak 1994). El AR es muy similar al análisis de correspondencia canónica (Ter Braak 1994), sin embargo se ha sugerido que este último es más apropiado en estudios en que el rango abarcado por las variables independientes es amplio. En el caso del presente estudio, los datos provienen de puntos de colecta en un mismo bosque templado, por lo cual el rango de variación de las abundancias relativas de estructuras de la hojarasca no fue muy amplio, caso en el que se recomienda el uso del AR (Ter Braak & Prentice 1988). Tradicionalmente este tipo de análisis han sido utilizados en estudios de Ecología de Comunidades en donde se busca relacionar las abundancias de las especies presentes en un conjunto de sitios con variables ambientales abióticas locales. En este caso, la intención fue investigar la influencia de la composición biológica del detritus, es decir, las abundancias relativas de cada uno de los componentes de la hojarasca (variables independientes) sobre las variables químicas (contenido de C, N y relación C/N), contenido hídrico y actividad diazotrófica (TRA) del mismo (variables dependientes). Todas las variables fueron estandarizadas y se utilizó el software CANOCO para Windows (versión 4.02, Centre for Biometry Wageningen). La salida del análisis es un diagrama de ordenación llamado "triplet" en el cual las muestras se indican como puntos, y las variables

dependientes e independientes, como flechas o vectores desde el origen (intersección de ejes). Los vectores apuntan en la dirección y de máxima variación y su magnitud es proporcional a la tasa máxima de variación de las respectivas variables en el espacio de ordenación (Ter Braak & Prentice 1988). Las variables (dependientes o independientes) cuyos vectores apuntan en direcciones similares presentan una alta correlación positiva entre ellas; si los vectores forman un ángulo cercano a los 90°, la correlación es cercana a cero; los vectores que apuntan en sentidos opuestos presentan correlación negativa (Ter Braak & Prentice 1988).

Finalmente, como complemento a los análisis multivariados mencionados más arriba, se aplicó una prueba parcial de Mantel (Fortin & Gurevitch 1993) para evaluar la asociación entre la matriz **T** (diferencias de TRA) y la matriz **N** (diferencias de contenido de N), corrigiendo por, o estableciendo constante la influencia de la matriz **D** (diferencias en composición de la hojarasca). También se evaluó la asociación entre **T** y **D**, corrigiendo por el efecto de **N**.

III.4. Resultados

III.4.1. Nitrógeno inorgánico disuelto

Los experimentos de laboratorio indicaron que la adición de NID a la hojarasca afectó la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 en la misma (Figura 19), sin embargo dicho efecto sólo fue observado en el segundo experimento. En el primer experimento no se encontraron diferencias significativas de TRA entre tratamientos (análisis de varianza de una vía, $F_{(1,27)} = 0,825$, $P = 0,372$; Figura 19 A). En el segundo experimento solo a partir del tercer nivel de adición de NID (10 mM NH_4NO_3) se verificó un efecto significativo de la adición de NID sobre la TRA (análisis de varianza de una vía, $F_{(4,35)} = 178,856$, $P < 0,001$; Figura 19 B).

Se observó una relación negativa entre TRA y el contenido de NID en la hojarasca de los tres primeros niveles de adición del experimento B (Figura 20). El modelo exponencial negativo presentó el mayor ajuste a los datos, comparado con el modelo lineal ($R^2 = 0,547$, mod. exponencial vs. $R^2 = 0,538$, mod. lineal). En análisis de regresión exponencial negativa resultó significativo ($F_{(1,10)} = 12,071$, $P < 0,05$).

III.4.2. Temperatura e iluminación

Se encontró un efecto significativo de la temperatura de incubación sobre la tasa de reducción de acetileno de hojarasca en laboratorio (ANOVA una vía, $F_{(4,42)} = 303,648$, $P < 0,001$), y el tratamiento de 21 °C produjo la máxima actividad de reducción de acetileno. Las temperaturas extremas (7 y 31,5 °C) presentaron los niveles más bajos de TRA (Figura 21).

El modelo Gaussiano resultó ser el con mejor ajuste de la relación entre TRA y temperatura (Figura 21, Tabla 13). El parámetro "c" del modelo Gaussiano corresponde a la temperatura óptima de la FNS que fue estimada en 20 °C (Tabla 13).

No se encontró un efecto significativo de la iluminación sobre la tasa de reducción de acetileno en el laboratorio (prueba t, $t = 0,031$, $P = 0,976$).

III.4.3. Contenido hídrico

Los dos experimentos de adición de agua, con hojarasca secada *in situ* y en el laboratorio, cubrieron distintos rangos de contenido hídrico (Figura 22). Sólo en el segundo experimento (B) se encontró un efecto significativo de la adición de agua desionizada sobre la TRA (análisis de varianza $F_{(3,16)} = 3,965$, $P = 0,027$), y se observó una tendencia positiva significativa de la TRA en función del contenido hídrico efectivo de las muestras, en el rango de 0,7 a 2,0 g H₂O g⁻¹ (Figura 22 B). En cambio, en el primer experimento (A) no se verificó un efecto significativo de la adición de agua (análisis de varianza de una vía, $F_{(3,16)} = 0,842$, $P = 0,490$), ni una tendencia significativa de TRA en función del contenido hídrico, en el rango de 1,8 a 3,0 g H₂O g⁻¹, (Figura 22 A).

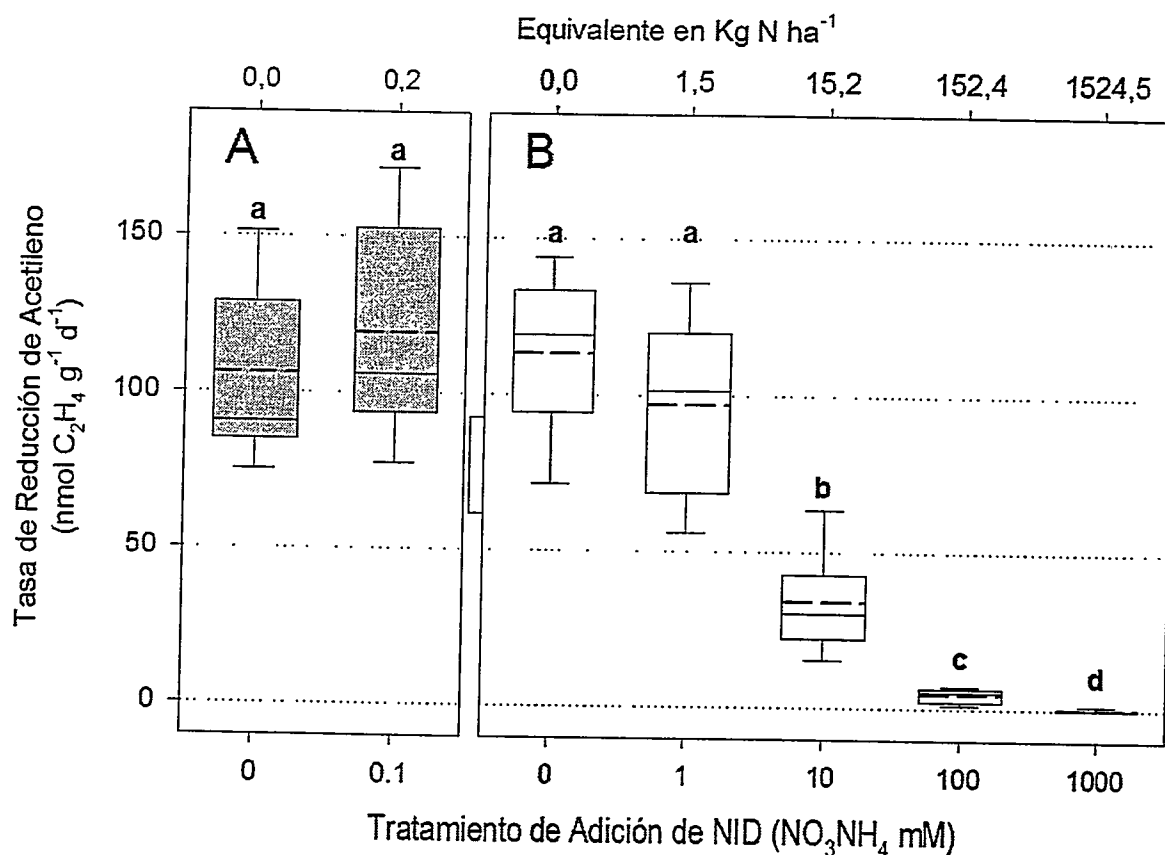


Figura 19

A y B. Experimentos de adición de NID (como nitrato de amonio). El eje horizontal representa los niveles de adición de NO₃NH₄, y su equivalente en Kg N ha⁻¹ (parte superior). El eje vertical, la tasa de reducción de acetileno (TRA). Las cajas representan el intervalo del 50% de la distribución, y las barras de error, el intervalo del 90%. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana, y la línea punteada, la media. Las letras indican diferencias entre tratamientos, según prueba *a posteriori* de Tukey y análisis de varianza de una vía del $\ln(1+TRA)$ como variable dependiente (**A**: $F_{(1,27)} = 0,825$, $P = 0,372$; **B**: $F_{(4,35)} = 178,856$, $P < 0,001$). Se observa un cambio significativo de la tasa de FNS a partir de la adición de 20 ml de NO₃NH₄ 10 mM.

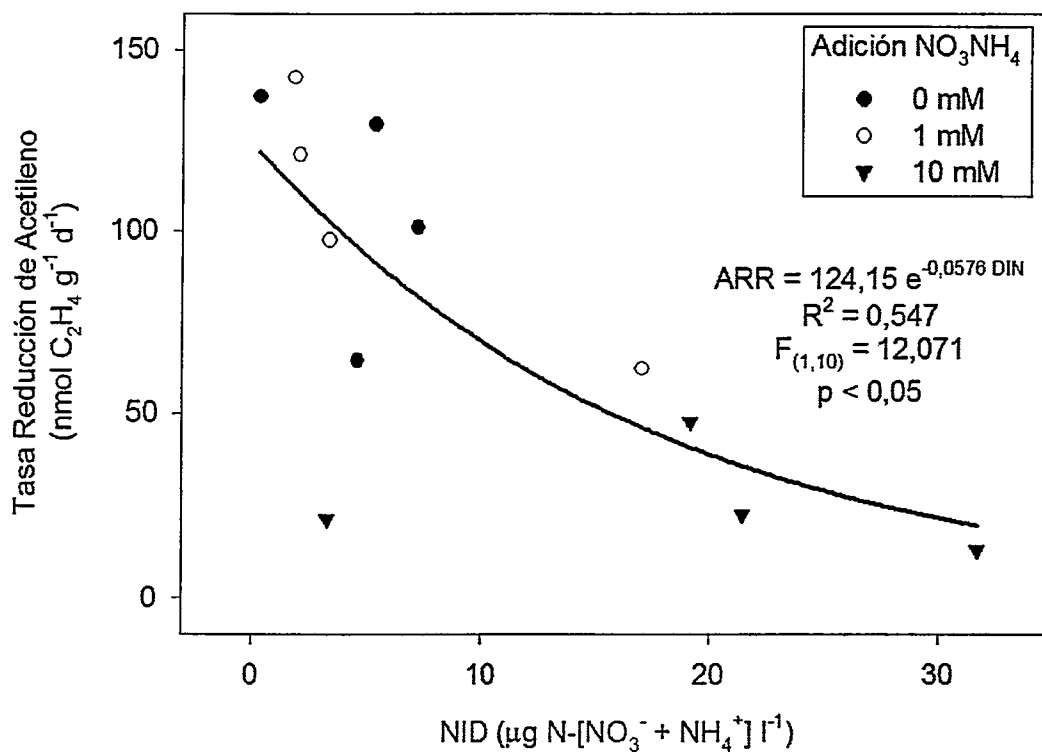


Figura 20

Relación entre el contenido de NID y TRA en la hojarasca, con datos de los tres primeros niveles de adición de NID (0, 1 y 10 mM NO_3NH_4) del experimento B. NID expresado como masa de N en nitrato y amonio por unidad de volumen de agua presente en la hojarasca. Se observa una relación negativa descrita por decaimiento exponencial. Se indican la ecuación y los estadísticos del análisis de regresión correspondiente.

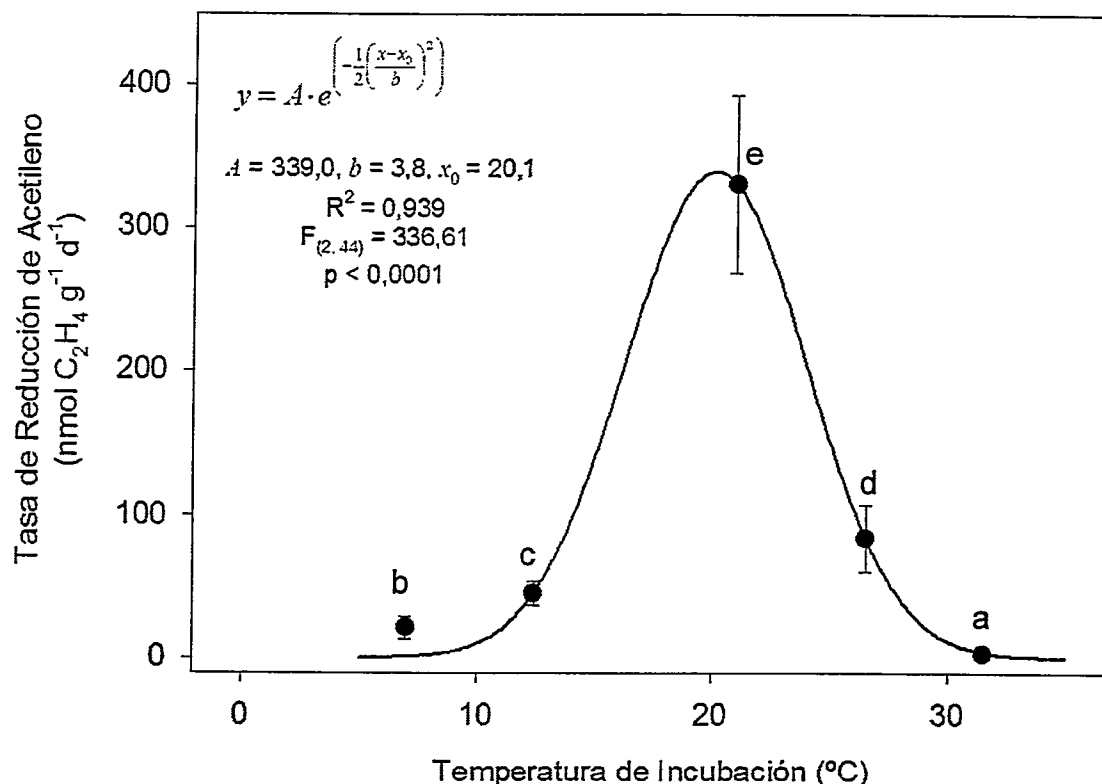


Figura 21

Experimento de laboratorio para determinar el efecto de la temperatura sobre la FNS. Las muestras de hojarasca fueron colocadas dentro de frascos de vidrio según la metodología estándar del ensayo de reducción de acetileno, e incubadas dentro de una cámara termostática. Se realizaron 5 incubaciones sucesivas en una misma cámara fijando distintas temperaturas en oscuridad. Los puntos corresponden a promedios \pm DE ($n = 10$, excepto tratamiento de $31,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $n = 7$). En el gráfico se indica con letras las diferencias entre tratamientos (ANOVA, $F_{(4,42)} = 178,180$, $P < 0,001$). Se aplicó un modelo de regresión Gaussiano, obteniendo un alto nivel de ajuste ($R^2 = 0,94$). Estimaciones de bootstrap de parámetros se presentan en Tabla 5.

Tabla 13.- Análisis de regresión no lineal y estimaciones de bootstrap de parámetros (\pm EE) de modelos Cuadrático y Gaussiano para describir la relación de tasa de reducción de acetileno (TRA) y temperatura de incubación en laboratorio (T).

Modelo	Parámetro \pm EE (Bootstrap)			R ²	F _(2,44)	P
	a	B	c			
Cuadrático						
TRA = a + bT + cT ²	-375,4 \pm 57,7	61,4 \pm 8,3	-1,6 \pm 0,2	0,558	27,7	<0,001
Gaussiano						
TRA = ae ^{$-\frac{1}{2}(\frac{T-c}{b})^2$}	340,1 \pm 21,3	3,8 \pm 0,1	20,1 \pm 0,1	0,940	336,6	<0,001

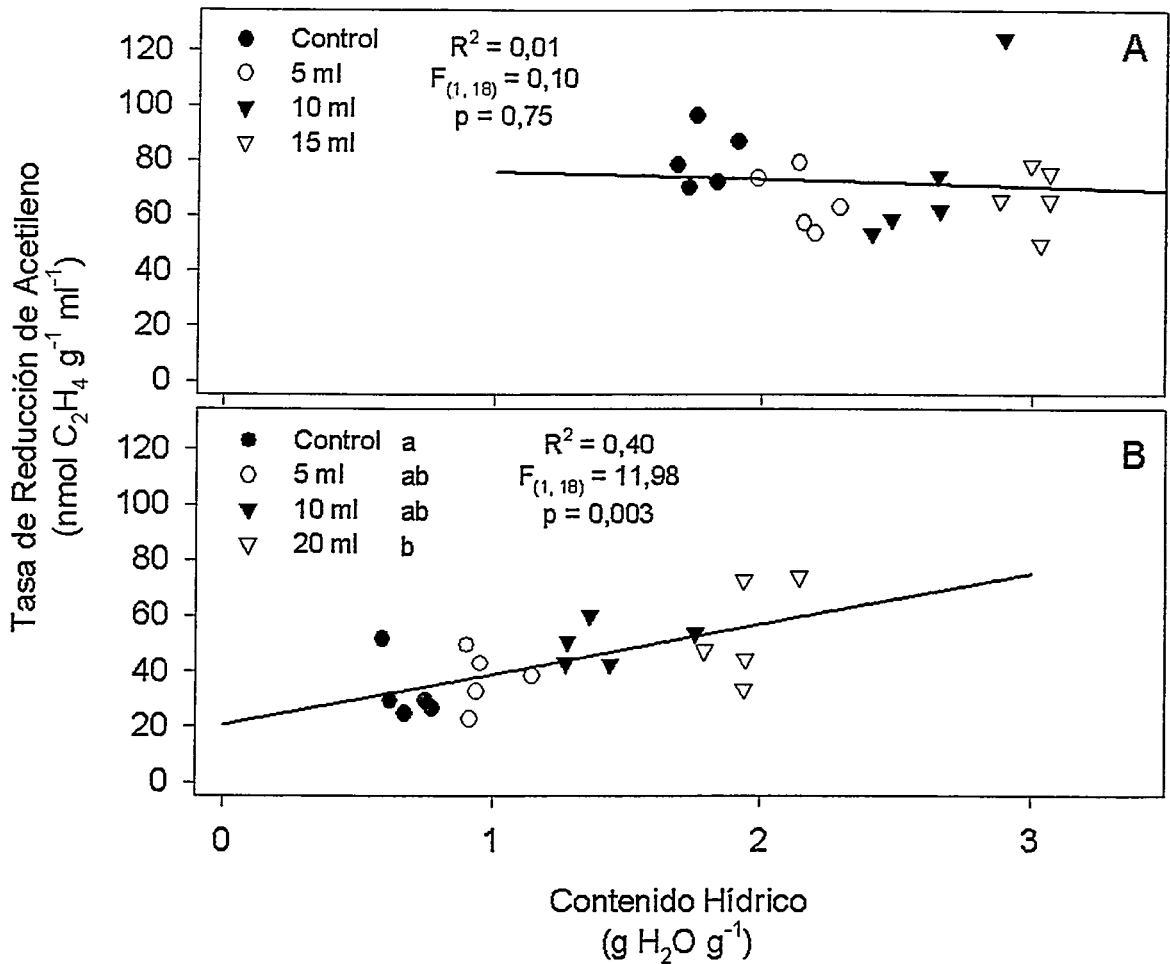


Figura 22

A y B. Experimentos de laboratorio para determinar el efecto del contenido hídrico sobre la FNS. Se agregó un volumen variable de agua desionizada a grupos de 5 muestras de hojarasca fresca, estimando luego su tasa de reducción de acetileno a 20°C. El grupo control consistió en hojarasca sin humedecer (0 ml) previamente secada al aire. En **A**, la hojarasca fue secada en el laboratorio dentro de una caja de plástico sin tapar durante una semana antes del ensayo. En **B**, se utilizó hojarasca colectada luego de un período prolongado de sequía en el sitio de estudio. En **B** se detectó una tendencia significativa de TRA en función del contenido hídrico de las muestras. Las letras junto a la leyenda en B indican diferencias significativas entre grupos (ANOVA, **A**: $F_{(3,16)} = 0,842$, $P = 0,490$; **B**: $F_{(3,16)} = 3,965$ $P = 0,027$).

III.4.4. Variabilidad conjunta de variables abióticas y químicas

El análisis de la variabilidad espacial conjunta *in situ* de la TRA, temperatura, luminosidad, contenido hídrico, contenido de N y C de Enero 2001 (Tabla 14) solamente mostró un efecto positivo significativo del contenido total de N sobre TRA (Tabla 14), sin embargo el modelo global de regresión múltiple resultó no significativo ($P = 0,07$, Tabla 14). En el ensayo de laboratorio de Febrero del 2002 no se observó un efecto significativo del contenido de N, sin embargo el modelo global resultó significativo (Tabla 13). El modelo de regresión múltiple dio cuenta de un 12 % de la varianza *in situ* y de un 16% de la varianza de TRA en condiciones de laboratorio (valores de R^2 en Tabla 13). Se observó una alta correlación negativa entre el contenido total de N y la relación C/N de las muestras de hojarasca de los ensayos de Enero del 2001 y Febrero del 2002 (r (Pearson) = $-0,952$ y $-0,932$, respectivamente). Por esta razón, esta última variable fue descartada de los análisis realizados en esta sección. Ni la temperatura ni la iluminación ni el contenido hídrico influenciaron significativamente la variación de la TRA según el modelo lineal de regresión múltiple.

No se encontró una asociación significativa entre la matriz de diferencias de TRA y la matriz de diferencias de iluminación entre puntos (prueba de Mantel T vs. L, Tabla 14). De igual forma, la asociación entre T y la matriz de diferencias de contenido hídrico (CH) de los datos de Enero 2001 tampoco fue significativa (Tabla 14). En cambio, la asociación estadística entre T y la matriz de diferencias de contenido total de N entre muestras fue significativa en el ensayo *in situ* de Enero del 2001 (prueba de Mantel, Enero 2001, T vs. N, Tabla 14), pero no significativa en el ensayo de laboratorio de Febrero del 2002 (prueba de Mantel, Febrero 2002, T vs. N, Tabla 14).

Tabla 14.- Análisis de Regresión múltiple de los datos estandarizados correspondientes a los ensayos de Enero 2001 (*in situ*) y Febrero 2002 (laboratorio). Se indican los coeficientes de regresión parcial estandarizados, sus respectivas probabilidades (prueba t) entre paréntesis y los estadísticos de la regresión.

Variable/Estadístico	Enero 2001 <i>(in situ)</i>	Febrero 2002 (Laboratorio)
Nitrógeno Total (% masa)	0,3556 (0,0200)	0,1518 (0,3093)
Carbono Total (% masa)	0,0186 (0,8969)	0,1963 (0,1642)
Contenido Hídrico (g H ₂ O g seco ⁻¹)	0,0516 (0,7407)	0,2480 (0,1056)
Temperatura (°C)	0,0106 (0,9368)	-
Iluminación (Lux)	-0,1289 (0,3433)	-
n	54	51
R ²	0,1570	0,1232
F	2,2816	3,3726
P	0,0738	0,0426

Tabla 15.- Coeficientes de correlación de Mantel entre matrices de distancia o diferencia de tasa de reducción de acetileno (**T**), composición biológica (**D**), contenido total de nitrógeno (**N**), contenido hídrico (**CH**) e iluminación (**L**) entre muestras de hojarasca y/o puntos de incubación. Se indican las probabilidades de 1 y 2 colas para la prueba de aleatorización de Mantel de 5000 permutaciones.

Ensayo	Matrices de Distancia			Probabilidad	
	A	B	r_{AB}	1 cola	2 colas
Enero 2001 (<i>in situ</i>)	T	L	-0,0734	0,1612	0,8390
	T	CH	0,0703	0,1448	0,1448
	T	N	0,2151	0,0052	0,0052
Febrero 2002 (Laboratorio)	T	N	0,0116	0,3883	0,3883
	T	D	0,0633	0,2330	0,2330
	N	D	0,5610	0,0002	0,0002

III.4.5. Composición biológica

La hojarasca del sitio de estudio estuvo constituida mayoritariamente por material leñoso fino (46% de la biomasa, Tabla 15), y en segundo lugar por el material foliar (33% de la biomasa). En este último, las mayores abundancias relativas correspondieron a la hojarasca de las especies dominantes del bosque estudiado. El material fragmentado e indeterminado constituyó, en promedio, el 21% de la biomasa de hojarasca (Tabla 15).

Los dos primeros ejes de ordenación del análisis de componentes principales de los datos de abundancia relativa de los componentes de la hojarasca explicaron el 38,5% de la varianza (Figura 23, Tabla 15). La variable original con mayor contribución (loading) significativa en el primer componente fue la abundancia relativa de material leñoso. En el segundo componente, la proporción de hojarasca de especies de Mirtáceas tuvo la mayor contribución, pero no fue significativa ($P = 0,0730$, Tabla 15). Solo se observó un efecto significativo del segundo componente principal sobre TRA (análisis de regresión múltiple $F_{(1,50)} = 3,136$, $P = 0,059$; $t = 2,475$, $P = 0,01$), observándose una asociación significativa entre ambas variables (Figura 24).

La asociación entre la matriz de distancias Euclidianas composicionales y la matriz de diferencias de TRA entre muestras de hojarasca no fue significativa (prueba de Mantel T vs. D, Tabla 14).

Tabla 16.- Composición promedio (biomasa y proporción) y análisis de componentes principales (ACP) de 52 muestras de hojarasca colectadas al azar dentro de la grilla experimental del sitio del Parque Nacional Chiloé en Febrero 2002. Se indican los coeficientes (loadings) o contribución de cada variable en los dos primeros componentes (CP1 y CP2), con sus respectivos valores propios y proporción de varianza explicada. Los valores entre paréntesis indican probabilidad de prueba de significancia estadística de parámetros del ACP (bilateral) descrita en la sección III.3.3.

Tipo de Material/Especie	Promedio \pm DE		Coeficientes ACP	
	Biomasa (g m ⁻²)	Proporción (%)	CP 1	CP2
Material Foliar				
<i>Nothofagus nitida</i>	53,06 \pm 1,49	13,1 \pm 8,3	0,439 (0,3600)	-0,602 (0,1230)
<i>Drimys winteri</i>	39,42 \pm 1,30	10,4 \pm 9,6	0,444 (0,3400)	0,490 (0,2430)
<i>Chusquea</i> sp.	12,39 \pm 0,84	3,5 \pm 5,9	0,077 (0,8715)	0,360 (0,3890)
Podocarpaceae	7,95 \pm 0,29	2,4 \pm 3,1	0,586 (0,1625)	-0,013 (0,9800)
Mirtaceae	7,91 \pm 0,57	1,9 \pm 3,3	0,452 (0,3375)	0,646 (0,0730)
<i>Laureliopsis/Pseudopanax</i>	3,97 \pm 0,21	1,1 \pm 1,5	0,477 (0,2925)	-0,508 (0,2130)
<i>Desfontainea spinosa</i>	1,87 \pm 0,26	0,5 \pm 1,6	-0,046 (0,9240)	0,497 (0,1890)
<i>Philesia magellanica</i>	0,44 \pm 0,08	0,1 \pm 0,2	-0,167 (0,6945)	0,078 (0,8570)
<i>Griselinia</i> sp.	0,05 \pm 0,01	0,0 \pm 0,1	0,027 (0,9435)	-0,253 (0,4890)
Material leñoso	238,19 \pm 8,39	46,4 \pm 19,1	-0,955 (0,0005)	-0,123 (0,8130)
Material fragmentado & indeterminado	103,90 \pm 3,91	20,7 \pm 9,9	0,600 (0,1490)	-0,163 (0,7515)
Total	469,14 \pm 12,59	-		
Valor Propio			2,47	1,77
% Varianza explicada			22,48 (0,0050)	16,06 (0,0255)

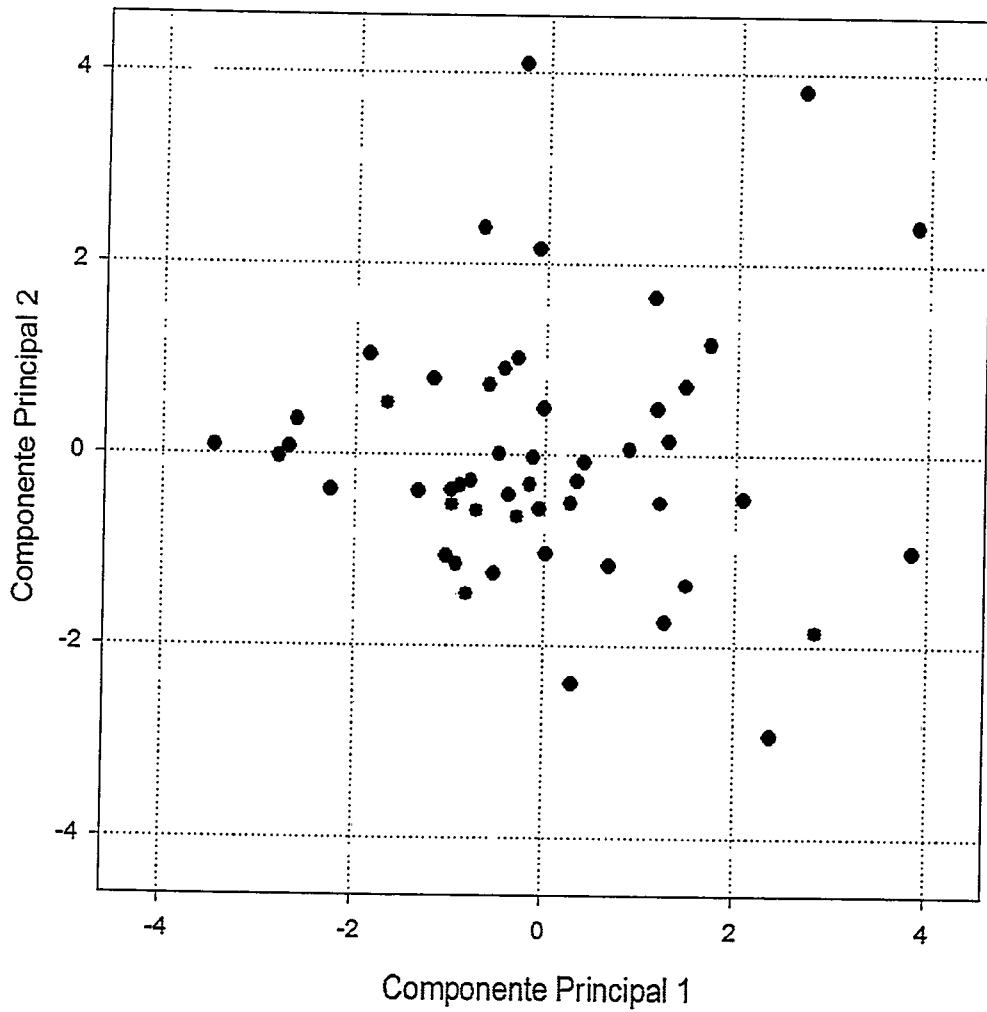


Figura 23

Ordenación de muestras de los dos primeros componentes principales de la abundancia relativa de los componentes de la hojarasca (detritus foliar por especie y material leñoso, Tabla 15).

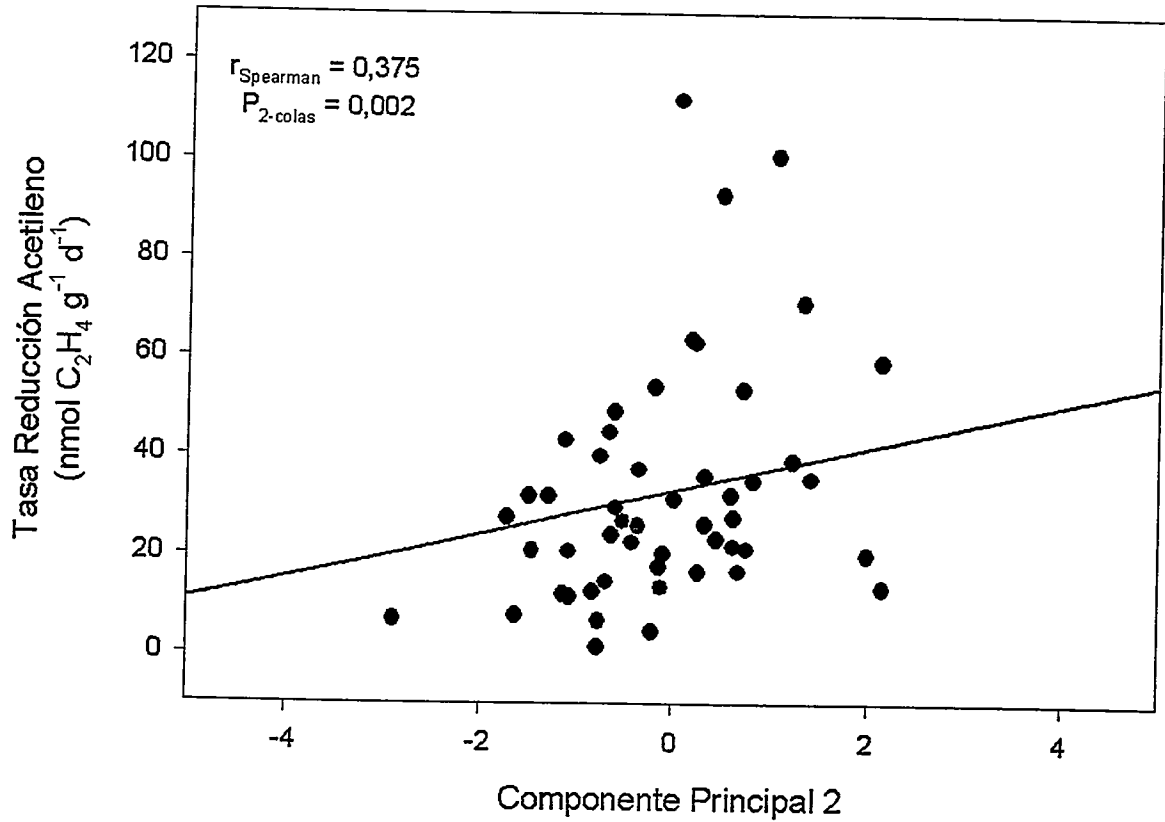


Figura 24

Relación entre la tasa de reducción de acetileno y el segundo componente principal de la composición biológica de la hojarasca. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Spearman (r) y la probabilidad bilateral estimada por prueba de aleatorización. El segundo componente principal está dominado por la abundancia relativa de hojarasca de especies de la familia Mirtaceae (Tabla 15).

III.4.6. Relación entre composición biológica y variables del detritus

ACP de variables químicas, contenido hídrico y TRA de hojarasca

Los dos primeros componentes principales de las variables químicas, contenido hídrico y TRA de la hojarasca explicaron, respectivamente, un 47% y 22% de la varianza observada en dichas variables (Tabla 16). El primer eje estuvo dominado por el contenido de N y la relación C/N, mientras que el segundo estuvo dominado por el contenido de C y TRA (aunque el coeficiente del (loading) de esta última variable no fue significativo, $P = 0,179$, Tabla 16). El primer componente se correlacionó negativamente con la abundancia relativa de material leñoso y positivamente con el material fragmentado e indeterminado, la hojarasca de *Chusquea* sp. y de Mirtáceas (Tabla 16). El segundo componente se correlacionó negativamente con la abundancia relativa de hojarasca de *D. winteri* y débilmente con el material fragmentado e indeterminado (Tabla 16).

Análisis de redundancia

Los resultados del análisis de redundancia se muestran en la Figura 25 y en la Tabla 17. El análisis dió cuenta de un 52,3% de la varianza de las variables dependientes (contenido de N, C, relación C/N, contenido hídrico y TRA). Los dos primeros ejes abarcaron un 86,6% de la variación ajustada de las variables dependientes. Todos los valores propios (varianzas) fueron significativos según la prueba de permutación de Monte Carlo ($F = 4,504$, $P = 0,0010$; Tabla 11). Centrando el análisis en la variable dependiente TRA, se observó una fuerte correlación positiva con el contenido de N y una marcada correlación negativa con la relación C/N. En cambio, el contenido hídrico y el contenido total de C se correlacionaron positivamente, pero débilmente con la TRA. Con respecto a la composición del detritus (variables independientes en el análisis), la TRA se asoció positivamente con los siguientes componentes de la hojarasca: hojarasca de *D. winteri*, Podocarpaceae, Myrtaceae,

Laureliopsis/Pseudopanax, Material Fragmentado e Indeterminado, *N. nitida*, y *D. spinosa*. En cambio, *P. magellanica*, *Griselinia* sp. y *Chusquea* sp. mostraron una asociación positiva débil con la TRA. El material leñoso fragmentado presenta una fuerte correlación negativa con la TRA (Figura 26).

La prueba parcial de Mantel indicó que no existe una asociación significativa entre la matriz de diferencias de la TRA y la matriz de diferencias en el contenido de N, corrigiendo por el efecto de las diferencias en composición del detritus ($r_{T,N,D}$ en Tabla 18). De igual forma, no se detectó una asociación significativa entre la matriz de diferencias de TRA y la matriz de distancias Euclidianas composicionales (**D**), corrigiendo por el efecto de las diferencias en contenidos de N entre muestras ($r_{T,D,N}$ en Tabla 18).

Tabla 17.- Coeficientes (loadings), valores propios y % de varianza explicada de los dos primeros ejes de ordenación de Análisis de Componentes Principales de variables de composición química (contenido de C y N), contenido hídrico y TRA, y correlaciones significativas de componentes con las abundancias relativas de las estructuras más abundantes de la hojarasca. Valores entre paréntesis corresponden a las probabilidades (bilaterales) de pruebas de aleatorización (sección III.3.3).

Variable	Componente	
	CP 1	CP 2
Contenido Hídrico	0,647 (0,2835)	0,048 (0,9530)
Contenido de N	0,927 (0,0005)	-0,013 (0,9850)
Contenido de C	-0,274 (0,7865)	-0,804 (0,0420)
Relación C/N	-0,909 (0,0005)	-0,028 (0,9635)
Tasa Reducción Acetileno	0,386 (0,6810)	-0,686 (0,1785)
Valor Propio	2,327	1,119
%Varianza explicada	46,547 (0,0005)	22,378 (0,7035)
Correlaciones		
Material leñoso	-0,712 (0,0005)	0,065 (0,6580)
Material Fragmentado & Indeterminado	0,695 (0,0005)	0,242 (0,0825)
<i>Nothofagus nitida</i>	0,190 (0,1880)	0,146 (0,3150)
<i>Drimys winteri</i>	0,133 (0,3370)	-0,531 (0,0010)
<i>Chusquea sp.</i>	0,380 (0,0070)	0,174 (0,2020)
Mirtaceae	0,307 (0,0355)	-0,091 (0,4930)

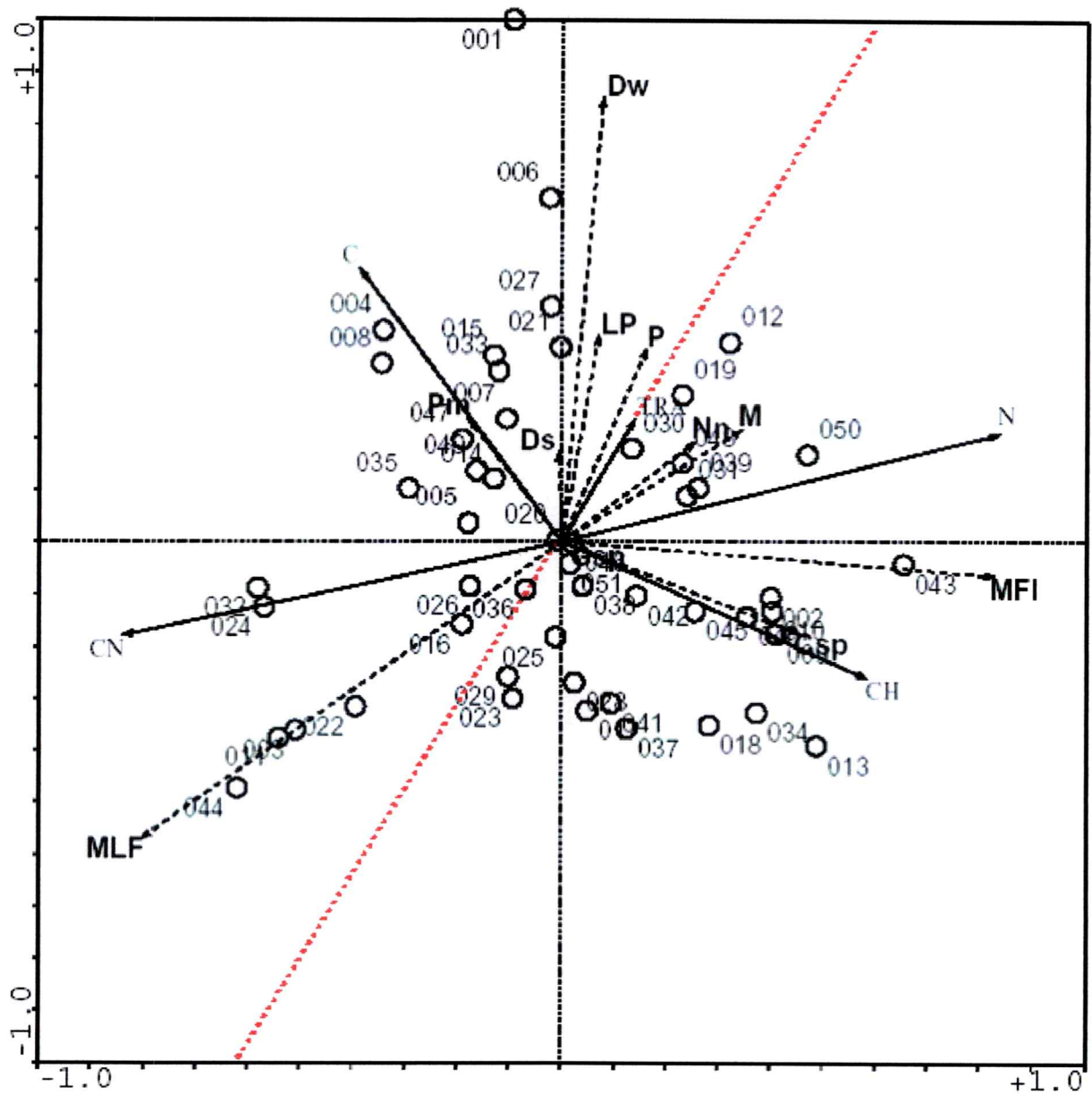


Figura 25
(Leyenda en la página siguiente)

Figura 25

“Triplot” de Análisis de Redundancia considerando como variables dependientes el contenido de nitrógeno (N), carbono (C), contenido hídrico (CH), relación C/N (CN) y tasa de reducción de acetileno (TRA) de muestras de hojarasca colectadas en Febrero 2002. Las variables independientes son las abundancias relativas de los componentes de la hojarasca: Nn = *Nothofagus nitida*, Dw = *Drimys winteri*, Csp = *Chusquea* sp., P = Podocarpaceae, M=Myrtaceae, LP=*Laureliopsis/Pseudopanax*, Ds = *Desfontainea spinosa*, Pm = *Philesia magellanica*, Gsp = *Griselinia* sp., MLF = Material Leñoso Fino y MFI = Material Fragmentado & Indeterminado. Todas las variables fueron estandarizadas y el análisis se efectuó con CANOCO v. 4.02 (n = 51). La línea roja punteada muestra la dirección del vector TRA. Los dos primeros ejes explicaron el 45,3% de la varianza de las variables dependientes, y un 86,6% de las varianzas ajustadas a las variables independientes. Los valores propios de los tres primeros ejes fueron 0,366, 0,087 y 0,048; la suma de todos los valores propios canónicos fue 0,523.

Tabla 18.- Análisis de Redundancia (RDA) de la composición de hojarasca (variables independientes) y variables químicas y fijación de N₂ (variables dependientes), de muestras colectadas en Febrero 2002 e incubadas en el laboratorio (20 °C). n = 51. Salida del programa CANOCO.

Parámetro	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Valor Propio	0,366	0,089	0,049
% Varianza	36,6	8,9	4,9
% Varianza Acumulado	36,6	45,5	50,4
% Varianza Restringida Acumulado	68,8	85,6	94,8
Correlación Variables Dep. vs. Indep.	0,895	0,648	0,496
Prueba de Permutación Monte Carlo (1000 permutaciones) Primer Valor Propio: F = 23,094, P = 0,0010 Total: F = 4,546, P = 0,0010.			
Coeficientes Canónicos			
<i>Material Leñoso Fino</i>	-0,3515	-0,3971	0,143
Podocarpaceae	-0,2086	0,2433	0,5801
<i>Nothofagus nitida</i>	0,062	0,0961	0,7348
Myrtaceae	0,078	-0,2112	0,0768
<i>Desfontainea spinosa</i>	0,1058	0,076	-0,1458
Material Fragmentado & Indeterminado	0,6614	-0,2749	-0,1807
<i>Chusquea sp.</i>	0,3718	-0,2034	0,0903
<i>Laureliopsis/Pseudopanax</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Philesia magellanica</i>	-0,1112	0,2834	0,2679
<i>Drimys winteri</i>	-0,0439	0,7055	-0,3705
<i>Griselinia sp.</i>	-0,003	0,1054	0,0768

Tabla 19.- Coeficientes de correlación parcial de Mantel entre matrices de diferencia de tasa de reducción de acetileno (T), composición biológica (D) y contenido total de nitrógeno (N) entre muestras de hojarasca incubadas en el laboratorio (Febrero 2002). Se indican las probabilidades de 1 y 2 colas para la prueba de aleatorización de Mantel de 5000 permutaciones. $r_{AB,C}$: coeficiente de correlación parcial de Mantel entre las matrices de distancia A y B, manteniendo la matriz de distancia C constante.

Ensayo	Matriz de Distancia			$r_{AB,C}$	Probabilidad	
	A	B	C		1 cola	2 colas
Febrero 2002 (Laboratorio)	T	N	D	-0,0289	0,3779	0,7093
	T	D	N	0,0686	0,2088	0,4075

III.5. Discusión

III.5.1 Control a nivel bioquímico: efecto del NID

A pesar de ser un fuerte inhibidor de la biosíntesis del complejo enzimático que cataliza la fijación de N_2 (Gussin et al. 1986), la adición experimental de NID en condiciones de laboratorio no produjo una reducción drástica de la actividad diazotrófica en la hojarasca del sitio de estudio. Fue necesario agregar una cantidad de NID equivalente, en promedio, a 17 veces el nivel basal de NID de la hojarasca (tratamiento 10 mM, Figura 19 B) para producir una caída significativa de la actividad diazotrófica. Esta cantidad es equivalente a una depositación de NID de 15 Kg N ha^{-1} , siendo un valor bastante alto comparado con la depositación anual de NID en el sitio de estudio del Parque Nacional Chiloé de $0,8 \text{ Kg N ha}^{-1}$ (Hedin et al. datos no publicados).

El cambio producido en el contenido de NID de la hojarasca al finalizar el experimento, fue pequeño comparado con la cantidad agregada, pero suficiente para causar una disminución de la actividad de fijación biológica de N_2 , observándose una relación exponencial negativa entre la TRA y el contenido de NID de muestras de hojarasca de los tres primeros niveles de adición de NID del experimento B (Figura 20). En consecuencia, los resultados sustentan parcialmente la hipótesis N° 1 propuesta, debido a que la adición de NID en niveles comparables a la depositación húmeda de sitios contaminados no produjo una inhibición de la FNS. No obstante, cabe señalar que los niveles de NID determinados en las muestras de los tres primeros niveles de adición, incluyendo el control, resultaron ser bastante bajos, incluso mucho menores que el umbral de inhibición de la biosíntesis de nitrogenaza documentado para la fijación de N_2 en la rizósfera de maíz ($4,2 \mu\text{g N ml}^{-1} = 0,150 \text{ mM}$, Zuberer 1998, Figura 20).

Los resultados de los experimentos de adición de NID sugieren que en la detritósfera existe una capacidad de amortiguar eventos discretos de altos niveles de deposición de N inorgánico disuelto, probablemente explicada por inmovilización microbiana y/o química de NID (Fog 1988) y emisiones gaseosas de N (por desnitrificación, nitrificación y/o volatilización de NH_3). Evidencia publicada indica que la inmovilización microbiana durante la descomposición del detritus es un mecanismo clave de retención *in situ* de nutrientes (Vitousek & Matson 1984, Downs et al. 1996), que podría actuar como amortiguador frente a incrementos del nivel de NID.

El NID ingresa a los ecosistemas principalmente a través de la lluvia y neblina, como deposición húmeda de N. Este fenómeno es crónico y variable a lo largo de grandes regiones del planeta (Galloway et al. 1994, Hedin et al. 1995). En las pruebas de laboratorio realizadas en esta tesis se evaluó la respuesta de la fijación no-simbiótica de N_2 frente a la simulación de un evento discreto de corta duración de deposición húmeda de N. Una deposición crónica de N, como la que ocurre en lugares contaminados del Hemisferio Norte, podría producir cambios permanentes en la comunidad microbiana de la detritósfera de los bosques templados, disminuyendo drásticamente la abundancia de diazótrofos, lo cual podría reducir, e incluso eliminar, el proceso de fijación no-simbiótica de N_2 *in situ*. Estos efectos pueden ser estudiados en experimentos de fertilización *in situ* de mediano y largo plazo, junto con la utilización de herramientas moleculares que permiten conocer la diversidad y abundancia tanto de diazótrofos como de otros grupos funcionales bacterianos (Shaffer et al. 2000, Widmer et al. 1999, Pepper & Josephson 1998, Rafael Guevara, comunicación personal).

III.5.2. Control ecológico de la FNS: variables abióticas

Los experimentos de laboratorio realizados con hojarasca del bosque de la Estación Biológica Senda Darwin, de características florísticas muy similares al del Parque Nacional Chiloé, demostraron que no existe un efecto directo de la iluminación sobre la actividad diazotrófica de la hojarasca, pero sí existe un efecto de la temperatura (Figura 21) y del contenido hídrico de la hojarasca (Figura 22). La temperatura óptima estimada de 20 °C estuvo por encima del rango documentado durante los ensayos *in situ* (4 – 16 °C, Capítulo I, Figura 9), de lo cual se deduce que el proceso de fijación no-simbiótica de N₂ en la hojarasca del bosque Nordpatagónico estudiado ocurre en condiciones sub-óptimas de temperatura la mayor parte del tiempo, siendo restringido por esta variable abiótica. Esto es congruente con la alta correlación observada entre el promedio de la TRA y la temperatura a lo largo del período de muestreo (Capítulo I, Tabla 3). En consecuencia, sólo la temperatura influye en el patrón estacional de la fijación biológica de N₂ en la hojarasca. La temperatura presentó una baja variación espacial *in situ* en Enero 2001 (rango 11,6 – 13,8 °C).

El hecho de descartar a la iluminación como restricción directa para la fijación de N₂ en la hojarasca, sugiere que los diazótrofos que utilizan la luz como fuente de energía (fotoautótrofos) tendrían una escasa importancia. Esto es congruente con la afirmación de que el proceso de FNS está dirigido principalmente por bacterias heterótrofas cuya fuente de energía es el carbono orgánico de la hojarasca (e.g. Vitousek et al. 2002). Sin embargo, en los bosques lluviosos pueden existir otros microhábitats en los que la iluminación puede afectar la actividad diazotrófica, como se demostró en la filósfera (superficie vegetal colonizada por microorganismos) de un bosque premontano de Costa Rica (Freigberg 1998).

El efecto del contenido hídrico fue significativo en niveles extremos de deshidratación del sustrato, en el rango de 0,7 a 2,0 g H₂O g⁻¹ (Figura 22 B), por debajo de los niveles observados *in situ* en el Parque Nacional Chiloé (1,5 – 3,8 g H₂O g⁻¹). De lo anterior se deduce que este factor tendría una reducida influencia sobre la fijación no-simbiótica de N₂ en condiciones naturales, salvo bajo episodios de sequía estival (Arroyo et al. 1995), que serían muy infrecuentes en bosques montanos expuestos a los vientos húmedos, como es el caso de la Cordillera de la Costa de Chiloé. Esto es congruente con la baja correlación observada entre los promedios de la TRA y el contenido hídrico a lo largo del período muestreado en el Parque Nacional Chiloé (Tabla 3).

III.5.3. Control de características locales del detritus

La variación espacial de la tasa de reducción de acetileno fue parcialmente explicada por las variaciones en la composición química y biológica del detritus vegetal. Se observó una discreta influencia positiva del contenido total de N de la hojarasca sobre la actividad diazotrófica *in situ*, pero el modelo de regresión lineal múltiple explicó una baja proporción de la varianza observada tanto en el campo como en el laboratorio (12–16%, Tabla 14). La prueba de Mantel reveló una asociación significativa entre el contenido de N y la tasa de reducción de acetileno *in situ*, pero no en laboratorio (Tablas 15 y 19). Sin embargo, el análisis de redundancia de los datos de laboratorio reveló una correlación entre N y TRA (ver más abajo). Este resultado es contra intuitivo según la hipótesis de que sustratos ricos en N tienen una menor actividad de fijación de N₂, debido a que en ellos habría mayor disponibilidad de N fijado (Capítulo II). Una posible explicación para esta aparente contradicción es que el contenido total de N de un sustrato orgánico está relacionado con la labilidad del sustrato, es decir, con la susceptibilidad a la descomposición (Chapin et al. 2002). La mayor

disponibilidad de N estimularía la actividad microbiana en general, incluyendo la degradación de celulosa y otros sustratos complejos, que puede producir un aumento en la disponibilidad de compuestos orgánicos simples (e.g. glucosa) que estarían disponibles como fuente de energía inmediata para los diazotófos, los cuales al ser menos eficientes en la captación del N disponible, fijarían el N₂ atmosférico. De lo anterior cabe esperar que sustratos con mayor contenido de N tienen mayor actividad microbiana. En un estudio realizado por Carmona et al. (datos no publicados) se determinó que la actividad respiratoria en condiciones de laboratorio (producción de CO₂), fue mayor en hojarasca del bosque Nordpatagónico estudiado que en hojarasca de un bosque cercano, dominado por coníferas (*Fitzroya cupressoides* y *Pilgerodendron uviferum*), cuya relación C/N fue mayor (Pérez et al. 2003). Este resultado apoya la idea de que en sustratos con mayor contenido de N hay una mayor actividad microbiana que favorecería la actividad diazotrófica en particular. Sin embargo, el contenido de sustratos lábiles y recalcitrantes (calidad de carbono orgánico) también puede afectar enormemente la actividad microbiana y la descomposición del detritus (Hobbie 2000). Los resultados del experimento de descomposición de hojarasca presentados en el capítulo II indican que el contenido de N total no explica por sí mismo la actividad diazotrófica del detritus vegetal.

El nulo efecto del contenido de carbono total sobre la TRA *in situ* (Tabla 14) puede interpretarse de dos formas. Primero, puede indicar que el contenido de C de la hojarasca es tan excesivo, que no sería un factor limitante para la fijación biológica de N₂. Segundo, puede indicar que la mayoría del C no se encuentra en una forma inmediatamente disponible para los diazotófos, estando contenido en macromoléculas recalcitrantes (e.g. lignina, ácidos húmicos). Dado que la hojarasca del horizonte orgánico está compuesta principalmente por material vegetal fresco, i.e., recientemente depositado, que se caracteriza por su alto contenido en compuestos fácilmente degradables

(e.g. celulosa o hemicelulosa) (Wagner & Wolf 1998), la explicación más factible es la primera. La materia orgánica del suelo mineral, cuyo estado de degradación es avanzado (i.e., con un prolongado tiempo de permanencia en el suelo) tiene un mayor contenido de compuestos recalcitrantes (Wagner & Wolf 1998), y presenta menor actividad diazotrófica (Pérez et al. 2004). Sin embargo, la hojarasca es un substrato muy heterogéneo que puede presentar grandes diferencias en su naturaleza química y calidad de C.

La composición biológica de la hojarasca influyó la variabilidad de la fijación no-simbiótica de N_2 . El análisis de componentes principales reveló el alto grado de heterogeneidad de la composición de la hojarasca, ya que los dos primeros componentes sólo abarcaron el 39 % de la varianza (Tabla 16 y Figura 23). Una dimensión importante de la variación composicional (segundo componente principal, 16% de la varianza, Tabla 16), relacionada con la abundancia relativa de hojarasca de especies de Mirtáceas, se asoció con la actividad diazotrófica (Figura 24), mientras que otra dimensión, relacionada con la abundancia de material leñoso, no tuvo ningún efecto sobre la fijación de N_2 (primer componente principal, 23% de la varianza, Tabla 16). Esto fue congruente con los resultados del análisis de redundancia y de componentes principales de las variables químicas (C, N, C/N, contenido hídrico) y microbiológicas (TRA) del detritus. En términos generales, el análisis de redundancia mostró que ocurre más fijación de nitrógeno en hojarascas dominadas por material foliar de las especies dominantes del bosque y material fragmentado, los cuales tienen un mayor contenido total de N y presentan una menor relación C/N. Lo contrario ocurre cuando aumenta la proporción de material leñoso de la hojarasca (Figura 25). El análisis de componentes principales de la composición fisicoquímica (C, N, C/N y H_2O) y actividad diazotrófica de la hojarasca también reveló una fuerte asociación con la composición de la hojarasca (Tabla 17). Todo lo anterior indica que la variación espacial de la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 puede ser explicada por las

variaciones en composición de la hojarasca al interior del bosque. Sin embargo, la asociación entre la actividad diazotrófica y la composición de la hojarasca no fue confirmada por la prueba de Mantel parcial (Tabla 19), lo cual indica que existe una importante proporción de la variación local de la tasa de fijación no simbiótica de N_2 cuyos controles aún no están claros. Esta proporción no explicada por composición biológica (ni temperatura, debido a que se mantuvo constante en el ensayo de laboratorio) puede estimarse considerando la Figura 24, en donde sólo un 14% de la varianza ($r^2 = (0,375)^2 = 0,141$) de la TRA se explicó por la variación del segundo componente principal de composición biológica de la hojarasca (CP 2, el cuál sólo abarcó el 16% de la varianza en composición), dejando un 86% sin explicar.

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se contribuyó al conocimiento del proceso de fijación biológica de N_2 en la detritósfera de los bosques templados de Sudamérica. Se consideró a la detritósfera, o capa de detritus superficial, como un componente relevante de estos ecosistemas por su extensión, biomasa y actividad microbiana, examinando los mecanismos que controlarían la dinámica del N dentro de este componente, como parte del ciclo de N ecosistémico. Muchos autores han reconocido la importancia de la capa de detritus superficial en el funcionamiento de los ecosistemas de bosques templados (e.g. Magill & Aber 2000, Currie 1999, Currie et al. 1999). En estos ecosistemas, el tiempo de residencia de la hojarasca (de varios meses a años) es lo suficientemente prolongado como para producir una acumulación permanente de material orgánico y, al mismo tiempo, posibilitar un flujo rápido de carbono y nutrientes a través de ella (Currie 1999). En consecuencia el ingreso de N a este componente del ecosistema, a través de la actividad de microorganismos fijadores de N es un flujo que contribuye al ciclo interno del N (Figura 3 y 27).

Sin embargo, el flujo de ingreso de N a través de la fijación no-simbiótica de N_2 en la hojarasca fue estimado en esta tesis en $0,2 \pm 0,02 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, un valor que es un orden de magnitud menor que la deposición húmeda de N estimada por la concentración de N total en la precipitación y neblina en el bosque del Parque Nacional de Chiloé (ca. $2 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, Hedín et al., datos no publicados, flujo 4 de las Figura 3 y 27). Sin embargo, la fijación de N en la detritósfera es del mismo orden de magnitud y representa cerca de un cuarto de la deposición húmeda de NID (ca. $0,8 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, Hedín et al., datos no publicados), es decir el nitrógeno biológicamente activo. Por otro lado, el flujo

de N fijado biológicamente en el detritus fue considerablemente menor y, por lo tanto, no puede compensar la pérdida o exportación hidrológica total de N documentada en las cuencas forestadas en Chiloé (ca. $5,8 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, Hedin et al. datos, no publicados, Perakis & Hedin 2002, flujo 10, Figura 27).

Bajo el supuesto de que los bosques de antiguo crecimiento se encuentran en un estado estacionario o equilibrio dinámico, respecto al flujo de nutrientes, el resultado de esta tesis sugiere que la FNS en la hojarasca no explica el desbalance entre la deposición húmeda y la exportación hidrológica de N. Esto indica que el supuesto de equilibrio no es válido, o que existen flujos de ingreso de N no medidos, más aun si se consideran otras probables vías de pérdida ecosistémica de N (e.g. desnitrificación, nitrificación, volatilización de NH_3). Aún cuando se considere el aporte potencial de la FNS en la enorme biomasa de troncos caídos en estos ecosistemas forestales de antiguo crecimiento (Tabla 6), el aporte total de N vía fijación en la detritósfera ($0,7 \pm 0,2 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) no es suficiente para explicar este desbalance de N. Sin embargo, este ingreso de N es muy similar en magnitud a los aportes de N inorgánico vía precipitación (lluvia y neblina).

A pesar de que el supuesto de equilibrio en los flujos de nutrientes del ecosistema en estado sucesional avanzado es discutible, pues habría que demostrar que todos los componentes del ecosistema en estudio se encuentran en equilibrio dinámico de entradas y salidas de N, puede ser un supuesto razonable, ya que el bosque estudiado del Parque Nacional Chiloé es un ecosistema antiguo, de más de 200 años, es decir, en avanzado estado sucesional en donde las entradas de nutrientes igualan a las pérdidas o salidas, debido a que no habría más acumulación de biomasa (Reiners 1981). Pérez et al. (2004) demostraron que en una cronosecuencia de bosques secundarios de los alrededores de la Estación Biológica "Senda Darwin" en Chiloé, el flujo de N por FNS en la hojarasca es mayor en estados sucesionales intermedios y tiende a estabilizarse en los estados sucesionales avanzados (> 62 años). Este hecho

es congruente con el supuesto de estado estacionario, y se puede extender a bosques montanos de composición florística similar.

Comparando la FNS con el flujo interno de mineralización neta de N en el suelo mineral estimado para el sitio de estudio (ca. 34 Kg N ha año⁻¹, Perez et al. 1998) se constata que en los bosques antiguos, la cantidad de N que circula internamente es muy superior a los vectores de entradas y salidas del ecosistema. El N que ingresa a la detritósfera vía FNS es eventualmente mineralizado, (flujo 2, Figura 27), siendo utilizado por plantas (flujo 9) o microorganismos (flujo 3). Si bien el flujo de ingreso de N por la FNS es pequeño, constituye una inyección directa de nuevo N al ciclo interno de N en el ecosistema, ya que es incorporado al compartimiento orgánico del suelo (almacenamiento de N), y específicamente a la biomasa bacteriana, que tiene una alta tasa de recambio (Wagner & Wolf 1998).

Fijación no-simbiótica de N₂ en troncos caídos

Si bien la actividad de diazótrofos por unidad de masa de en los troncos caídos es menor que en la hojarasca, y está restringida sólo a la región periférica de estas estructuras (Capítulos I y II), la enorme biomasa de este componente determina su importancia en el flujo ecosistémico de FNS. En esta tesis se presentó una estimación muy aproximada de este flujo, debido a que no se contó con un registro estacional detallado de la actividad diazotrófica en los troncos. Sin embargo, al suponer 6 meses de actividad diazotrófica promedio al año, se obtiene una estimación bastante mayor que el correspondiente flujo de la FNS en la hojarasca ($0,6 \pm 0,2$ Kg N ha⁻¹ año⁻¹). Ciertamente los troncos caídos son otro componente relevante de la detritósfera, aunque su tiempo de recambio es mucho mayor (Harmon et al. 1986).

Comparación con otros ecosistemas forestales

El flujo de N a través de la FNS de la detritósfera, específicamente de la hojarasca, se encontró dentro del rango de otras estimaciones de fijación biológica de N_2 en el mismo compartimiento en ecosistemas forestales templados del Hemisferio Norte. En varios trabajos se han reportado valores entre 0,02 y 2 $Kg\ N\ ha^{-1}\ año^{-1}$ (Jurgensen et al. 1992, O'Connell & Grove 1987, Hendrickson 1990, Cushon & Feller 1989). Cleveland et al. (1999) realizaron una revisión de flujos de entrada de N vía fijación no-simbiótica estimados para diversos ecosistemas terrestres. En la Tabla 20 se muestra un resumen de las estimaciones correspondientes a ecosistemas de bosques templados, boreales, tropicales y esclerófilos. El valor estimado en el bosque templado de Chiloé fue similar al de otros bosques templados del hemisferio norte, pero inferior al de otros ecosistemas de bosques (boreal, esclerófilo y tropical) (Tabla 20). Cabe destacar que en los bosques boreales la acumulación de hojarasca y materia orgánica en general es mucho mayor que en los bosques templados (Chapin et al. 2002). Por otra parte, en los bosques tropicales y esclerófilos la temperatura es más elevada, lo que favorece la actividad microbiana en general.

Crews et al. (2000) estudiaron la FNS en hojarasca a lo largo de la sucesión primaria de largo plazo (> 300 años) en suelos volcánicos del archipiélago de Hawai y estimaron flujos que variaron entre 0,05 a 1,25 $KgN\ ha^{-1}\ año^{-1}$, en donde los mayores valores se observaron en los sitios más jóvenes. Estos flujos no son muy distintos de los 0,2 $Kg\ ha^{-1}\ año^{-1}$ estimados en los bosques de Chiloé.

En un estudio reciente, Pérez et al. (2004) estimaron el flujo de N por FNS en hojarasca de bosques pertenecientes a diversos estados sucesionales, localizados en los alrededores de la Estación Biológica "Senda Darwin" en el norte de Chiloé, y cuya composición florística fue similar a la del bosque

montano del Parque Nacional Chiloé. Se encontró que las entradas de N por FNS fueron mayores en bosques antiguos (estado sucesional avanzado; 0,23 y 1,41 Kg N ha⁻¹ año⁻¹) e intermedios (renovales; 0,61, 0,64 y 1,66 Kg N ha⁻¹ año⁻¹) que en bosques sucesionales tempranos (recientemente perturbados; 0,11 y 0,22 Kg N ha⁻¹ año⁻¹). Comparada con estos valores, la entrada ecosistémica de N por FNS en la hojarasca del bosque antiguo montano del Parque Nacional Chiloé es menor que la de los bosques intermedios y antiguos (sin considerar fijación en troncos caídos). Este hecho puede deberse a las diferencias climáticas, en especial de temperatura, que existen entre los bosques montanos de sectores altos de la Cordillera de la Costa y los bosques de tierras bajas de la zona norte de la Isla de Chiloé. Sin embargo, las diferencias también pueden deberse a otros factores como el mayor grado de fragmentación y perturbación antrópica que presentan los bosques sucesionales estudiados por Pérez et al. (2004).

Vías alternativas de fijación biológica de N₂

En el bosque pueden existir otras vías de ingreso de N a través de fijación biológica además de la fijación no-simbiótica en la detritósfera. Por ejemplo, se ha documentado actividad de diazótrofos de vida libre en la rizósfera (fijación asociativa de N₂, Zuberer 1998) y filósfera o superficie del follaje del dosel (e.g. Freiberg 1998) en bosques tropicales y templados. Los diazótrofos asociados a la filósfera corresponden generalmente a cianobacterias, cuya actividad está relacionada con la disponibilidad de agua y luz en el dosel. Freiberg (1998) estimó que la fijación no-simbiótica de N₂ en la filósfera de bosques tropicales premontanos de Costa Rica puede aportar entre 2 y 5 Kg N ha⁻¹ año⁻¹ al ecosistema, dependiendo del índice de área foliar.

En cambio, los diazótrofos asociados a la rizósfera corresponden a bacterias heterótrofas tolerantes a la acidéz (Dawson 1983) que reciben la influencia directa de los exudados de raíces y micorrizas. En ecosistemas de pastizales se ha demostrado que la fijación asociativa de N_2 en la rizósfera puede aportar hasta $76 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Maasdorp 1987).

El suelo mineral en sí mismo es otro hábitat ocupado por diazótrofos de vida libre, sin embargo las tasas de fijación de N_2 medidas en este componente en bosques sucesionales de Chiloé son muy pequeñas (Pérez et al. 2004).

Fijación simbiótica de N_2

La fijación simbiótica de N_2 es otro proceso que potencialmente puede contribuir a explicar el desbalance de N observado en el bosque templado del Parque Nacional Chiloé. Las asociaciones simbióticas entre diazótrofos y plantas vasculares son de amplia distribución e importancia en los ecosistemas terrestres (Vitousek et al. 2002). Entre ellas destacan las leguminosas, asociadas con *Rhizobium* y otros géneros afines (filogenéticamente), y las plantas asociadas con el actinomicete *Frankia*, conocidas como simbiosis "actinorrhízicas". Aunque esas asociaciones mutualistas son abundantes en bosques tropicales y subtropicales, las leguminosas no se encuentran en el interior de los bosques templados maduros y no perturbados de ambos hemisferios (Dawson 1983). En particular, las leguminosas y plantas actinorrhízicas (e.g. géneros *Colletia* y *Retanilla* en Chile; Carú et al. 1997) no están representadas en la flora del bosque templado húmedo de Sudamérica austral (Arroyo et al. 1995). Sin embargo, en la zona del bosque templado del sur de América también existen varias especies de plantas herbáceas del género *Gunnera* (e.g. Guevara et al. 2002) que están asociadas a cianobacterias diazótrofes del género *Nostoc*, pero que se encuentran

restringidas a hábitats abiertos por perturbación antrópica (e.g. cortes de caminos), hábitats semiacuáticos y a sitios abiertos en donde ocurre colonización primaria (e.g. suelos volcánicos, morrenas recientemente formadas, dunas costeras, etc. Aravena 1991). No se han observado plantas de *Gunnera* en el interior de bosques de edades intermedias o antiguos (Aravena et al. 2002).

Los tipos de asociaciones simbióticas más frecuentes en el interior del bosque templado son líquenes con fotobiontes cianobacterianos diazotrofos y algunos grupos de briófitas (particularmente antoceros) que pueden poseer asociaciones simbióticas con cianobacterias. Estos grupos de plantas, aunque con una biomasa pequeña en los bosques templados, podrían contribuir potencialmente al balance de N en este ecosistema (Galloway 1995, Serrano 1996). Aunque el análisis de la fijación simbiótica de N en líquenes y briófitas estuvo fuera de los objetivos de esta tesis, se realizaron algunos ensayos de reducción de acetileno que incluyeron muestras de un líquene epífita del género *Pseudocyphellaria* que se encontró en una rama caída del dosel, de briófitas epífitas colectadas en troncos de alerce (*Fitzroya cupressoides*) (muestras mixtas de varias especies de musgos y hepáticas, Pérez et al. datos no publicados) y de un antocero que crecía en el borde de un estero del sitio de estudio. Las muestras de líquen y del antocero revelaron una tasa alta de reducción de acetileno *in situ*, comparada con el promedio de hojarasca observado en el Parque Nacional Chiloé (Figura 26), en tanto que las briófitas epífitas no mostraron datos positivos importantes (incubación en el laboratorio). Estos datos sugieren que la fijación simbiótica de N registrada en algunas especies de líquenes y antoceros puede contribuir al ciclo del N en el ecosistema (Figura 27), aunque no se ha realizado una estimación del flujo de N a escala del ecosistema. Este flujo dependerá de la biomasa de estos organismos, que no ha sido estimada en estos bosques. A diferencia de la FNS, el flujo por cianobacterias simbióticas ingresa directamente al compartimiento

"vegetación" (biomasa liquénica y de antoceros). Posteriormente, estos organismos, al morir o desechar parte de sus estructuras, pueden liberar el N fijado quedando disponible para plantas y microorganismos a través del proceso de descomposición del detritus (e.g. Guzmán et al. 1990, Serrano 1996). Guzmán et al. (1990) encontraron que las constantes de descomposición de detritus de macrolíquenes en un bosque templado andino son elevadas comparadas con hojarasca. Sin embargo, los líquenes epífitos pueden sobrevivir largo tiempo sobre las plantas aún después de caer al suelo, lo que puede limitar el flujo de estos nutrientes (observación personal y Serrano 1996).

Dependiendo de su magnitud, la fijación simbiótica de N_2 por cianolíquenes y antoceros podría reducir el desbalance negativo observado en el ciclo del N en bosques antiguos de Chiloé (Hedin et al. 1995, y datos no publicados, Figura 27). Sin embargo, el desconocimiento de la biomasa de los líquenes y otros fijadores potenciales (que probablemente es reducida) no permite predecir que este flujo sea muy alto. En estas circunstancias, subsiste la interrogante respecto a las fuentes de N que permiten el balance en el largo plazo del ciclo del N en bosques templados australes. Estudios futuros deberían determinar en forma más precisa la magnitud de los flujos asociados con líquenes epífitos en el dosel arbóreo, antoceros asociados a cursos de agua y posibles diazótrofos asociados a la filósfera del bosque templado.

Tabla 20.- Comparación de flujos de N a través de la FNS en diversos ecosistemas de bosques. Basado en la revisión de Cleveland et al. (1999).

Tipo de Bosque	Substrato	Flujo de FNS	
		Rango	Promedio \pm EE (n)
Boreal	Suelo	0,3 – 2,8	1,1 \pm 0,5 (5)
Templado (Hemisferio norte)	Hojarasca	0,0 – 0,7	0,3 \pm 0,1 (6)
Templado (Hemisferio sur, Australia)	Hojarasca	-	2,5 (1)
Esclerófilo (Hemisferio Sur)	?	-	1,0 (1)
Tropical Siempreverde	Hojarasca/ Suelo	2,5 – 20,0	8,9 \pm 2,9 (6)
Tropical decíduo	?	-	3,3 (1)

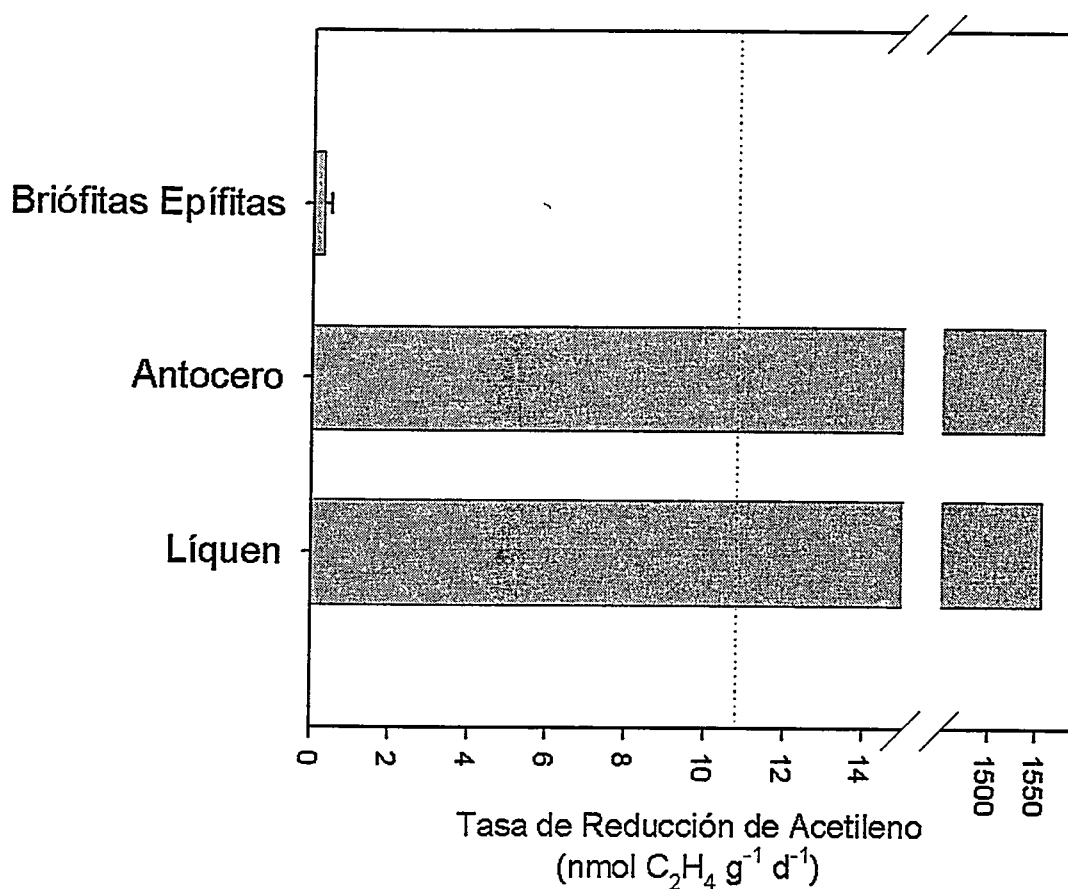


Figura 26

Tasas de reducción de acetileno en muestras de líquen (*Pseudocyphellaria*, n = 1, incubación *in situ*), de antocero (n = 1, incubación *in situ*) y de briófitas epífitas (n = 3, incubación de laboratorio) colectados en el sitio del Parque Nacional Chiloé durante el desarrollo de esta tesis. La línea punteada indica el promedio de la TRA *in situ* de la hojarasca. En el caso de las briófitas epífitas, la barra de error corresponde al error estándar.

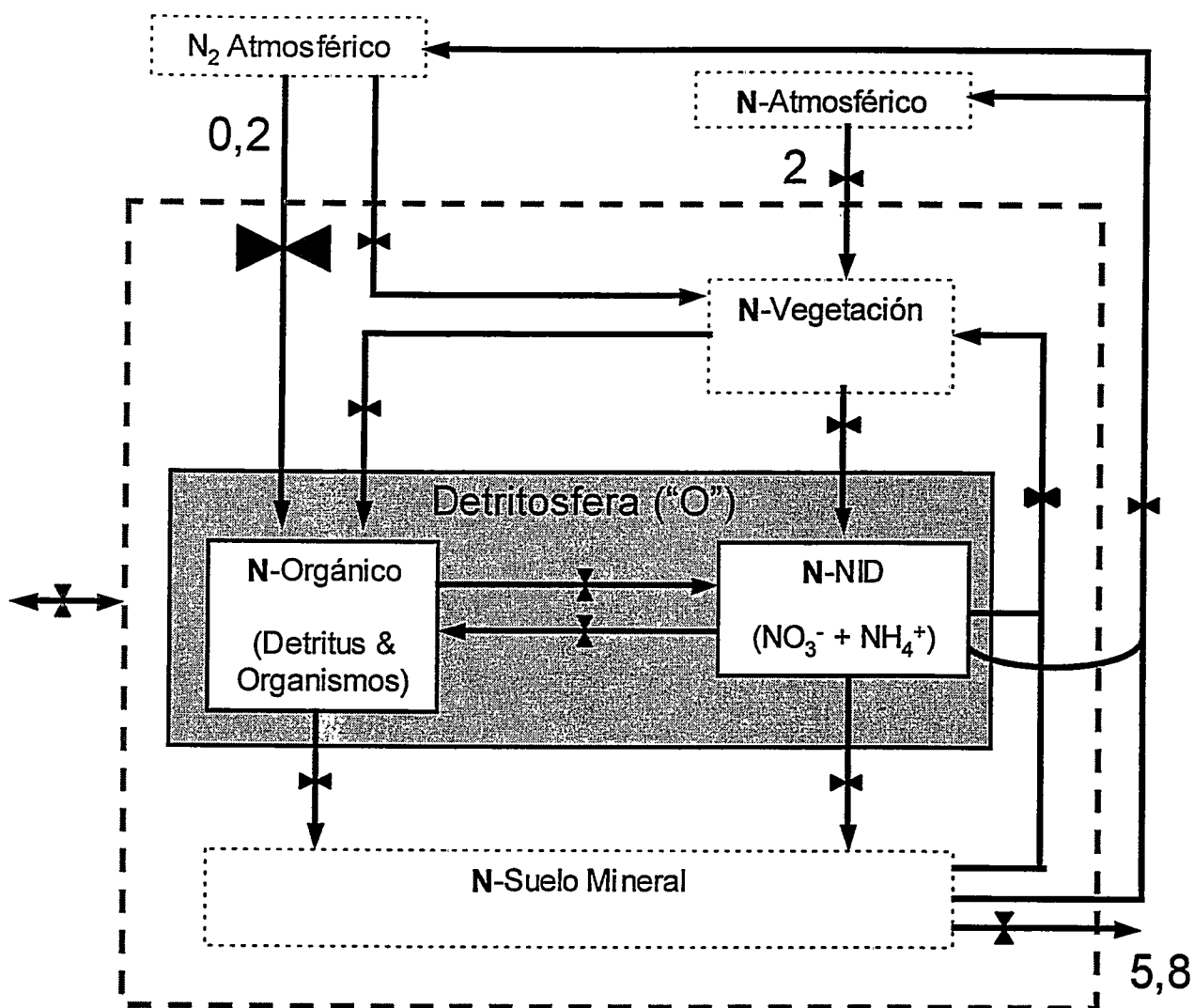


Figura 27

Diagrama conceptual del ciclo del N en un bosque templado lluvioso. Los flujos los mismos de la Figura 3. Línea punteada representa el límite del ecosistema. Se indican los flujos, en $\text{Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, de fijación no-simbiótica de N_2 en la hojarasca, deposición húmeda de N y exportación hidrológica de N estimados para el sitio del Parque Nacional Chiloé (Esta Tesis, Hedin et al., datos no publicados).

CONCLUSIONES

1. La entrada de N a nivel ecosistémico, a través de la fijación no-simbiótica de N_2 en la hojarasca del bosque Nordpatagónico estudiado se estimó en $0,2 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, a lo cual debe añadirse la fijación de diazotrofos del compartimiento leñoso, llegando a $0,7 \text{ Kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.
2. Este flujo de N es del orden de magnitud de la deposición húmeda y la exportación hidrológica de N inorgánico, pero no sería tan importante en el balance ecosistémico de N en este ecosistema, en donde las pérdidas de N total sobrepasan los $5 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.
3. La tasa de fijación no-simbiótica de N_2 varía estacionalmente debido a la fluctuación anual de la temperatura, con máximos en verano y mínimos invernales.
4. La actividad diazotrófica aumenta con el tiempo, durante el proceso de descomposición del detritus orgánico.
5. La variación espacial (a escala intra-rodal) de la tasa de fijación no-simbiótica de N_2 es explicada parcialmente, en un 14% de la varianza, por diferencias en la composición biológica y el contenido total de N de la hojarasca.

6. Debido a que la FNS no es un flujo importante en comparación con las pérdidas hidrológicas de N del ecosistema, es posible que la fijación simbiótica de N_2 por líquenes epífitos y antoceros, pueda contribuir al balance del ciclo de N en el ecosistema estudiado, aunque la magnitud de este vector se desconoce.

BIBLIOGRAFÍA

- Aber JD & Melillo JM (1991) Terrestrial ecosystems. Saunders College Publishing, New York. xiv + 429 pp.
- Aber JD, Nadelhoffer KN, Steudler P & Melillo JM (1989) Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience* 39: 378-386.
- Ågren GI & Bosatta E (1996) Theoretical ecosystem ecology. Cambridge University Press. Pp. 19-33.
- Aravena JC (1991) Análisis de la estructura y la flora de los bosques de Chiloé continental e insular. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Botánica. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Aravena JC, Carmona MR, Pérez CA & Armesto JJ (2002) Changes in tree species richness, stand structure and soil properties in a successional chronosequence in northern Chiloé Island, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 339-360.
- Armesto JJ, Villagrán C, Aravena JC, Pérez C, Smith-Ramirez C, Cortés M & Hedin L (1995) Conifer forests of the Chilean coastal range. En: Enright NJ & Hill RS (editors) *Ecology of the southern conifers*. Melbourne University Press. pp. 156-170.
- Arroyo MTK, Cavieres L, Peñalosa A, Riveros M & Faggi AM (1995) Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de Sudamérica. En: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo MK (editores) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. pp 71-100.
- Beare MH, Coleman DC, Crossley Jr DA, Hendrix PF & Odum EP (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* 170: 5-22.
- Black CA, Evans DD, White JL, Ensminger LE & Clark FE (1965) Methods of soil analysis. Part 2-Chemical and microbiological properties. *Agronomy* N° 9. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Bocock KL & Gilbert OJ (1957) The disappearance of leaf litter under different woodland conditions. *Plant and Soil* 9: 179-185.
- Brunner A & Kimmins JP (2003) Nitrogen fixation in coarse woody debris of *Thuja plicata* and *Tsuga heterophylla* forests on northern Vancouver Island. *Canadian Journal of Forestry Research* 33: 1670-1682.

- Carmona MR, Armesto JJ, Aravena JC & Pérez CA (2002) Coarse woody debris biomass in successional and primary temperate forests in Chiloé Island, Chile. *Forest Ecology and Management* 164: 265–275.
- Carú M, Sepúlveda D & Cabello A (1997) Spore germination of *Frankia* strains isolated from *Colletia hystrix* and *Retanilla ephedra* (Rhamnaceae). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 219–224.
- Chapin III FS, Matson PA & Mooney HA (2002) Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer, New York. xiv + 436 pp.
- Christie DA & Armesto JJ (2003) Regeneration microsites and tree species coexistence in temperate rain forests of Chiloé Island, Chile. *Journal of Ecology* 91: 776–784.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A & Wasson MF (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 623–645.
- Coleman DC & Crossley DA (1996) Fundamentals of soil ecology. Academic Press, San Diego. xvi + 205 pp.
- Crawford RH, Li CY & Floyd M (1997) Nitrogen fixation in root-colonized large woody residue of Oregon coastal forests. *Forest Ecology and Management* 92: 229–234.
- Crews TE, Farrington H & Vitousek PM (2000) Changes in asymbiotic heterotrophic nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. *Ecosystems* 3: 386–395.
- Currie WS (1999) The responsive C and N biogeochemistry of the temperate forest floor. *Trends in Ecology and Evolution* 14:316–320.
- Currie WS, Nadelhoffer KJ & Aber JD (1999) Soil detrital processes controlling the movement of ¹⁵N tracers to forest vegetation. *Ecological Applications* 9: 87–102.
- Cushon GH & Feller MC (1989) Asymbiotic nitrogen fixation and denitrification in a mature forest in coastal British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1194–1200.
- Dale MRT (1999) Spatial pattern analysis in plant ecology. Cambridge University Press, Cambridge. x + 326 pp.
- Dale MRT, Dixon P, Fortin MJ, Legendre P, Myers DE & Rosenberg MS (2002) Conceptual and mathematical relationships among methods for spatial analysis. *Ecography* 25: 558–577.
- Dawson JO (1983) Dinitrogen fixation in forest ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 979–992.
- Di Castri F & Hajek ER (1976) Bioclimatología de Chile. Vicerrectoría de Comunicaciones, Universidad Católica de Chile. Santiago. 129 pp.
- Downs MR, Nadelhoffer KJ, Melillo JM & Aber JD (1996) Immobilization of a ¹⁵N labeled nitrate addition by decomposing forest litter. *Oecologia* 105:141–150.
- Durka W, Schulze ED, Gebauer G & Voerkelius S (1994) Effects of forest decline on uptake and leaching of deposited nitrate determined from ¹⁵N and ¹⁸O measurements. *Nature* 372: 765–767.

- Eisele KA, Schimel DS, Kapustka LA & Parton WJ (1989) Effects of available P and N:P ratios on non-symbiotic dinitrogen fixation in tallgrass prairie soils. *Oecologia* 79: 471-474.
- Eviner VT, Chapin III FS & Vaughn CE (2000) Nutrient manipulations in terrestrial ecosystems. En: Sala OE, Jackson RB, Mooney HA & Howarth RW (editors) *Methods in ecosystem science*. Springer-Verlag, New York. Pp 291-307.
- Fog K (1988) The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews* 63: 433-462.
- Fortin MJ & Gurevitch J (1993) Mantel test: spatial structure in field experiments. En: Scheiner SM & Gurevitch J (editors) *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman & Hall, New York. 445 pp.
- Freiberg E (1998) Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in Costa Rican premontane rain forest. *Oecologia* 17: 9-18.
- Gallardo A (2003) Spatial variability of soil properties in a floodplain forest in northwest Spain. *Ecosystems* 6: 564-576.
- Galloway D (1995) Los líquenes del bosque templado de Chile. En: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo MK (Editores) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago. Pp. 101-112.
- Galloway JN, Levy II H & Kasibhatla PS (1994) Year 2020: consequences of population growth and development on deposition of oxidized nitrogen. *Ambio* 23: 120-123.
- Galloway JN, Keene WC & Likens GE (1996) Processes controlling the composition of precipitation at a remote southern hemisphere location: Torres del Paine national Park, Chile. *Journal of Geophysics Research* 101: 6883-6887.
- Galloway JN & Cowling EB (2002) Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio* 31: 64-71.
- Graham PH (1998) Biological dinitrogen fixation: symbiotic. En: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (editors) *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, USA. pp. 322-345.
- Griffiths RP, Harmon ME, Caldwell BA & Carpenter SE (1993) Acetylene reduction in conifer logs during early stages of decomposition. *Plant and Soil* 148: 53-61.
- Grimm NB & Petrone KC (1997) Nitrogen fixation in a desert stream ecosystem. *Biogeochemistry* 37: 33-61.
- Guevara R, Armesto JJ & Carú M (2002) Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts from *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STR fingerprinting. *Microbial Ecology* 44: 127-136.
- Gussin GN, Ronson CW & Ausubel FM (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. *Annual Review of Genetics* 20: 567-591.
- Guzman G, Quilhot W & Galloway DJ (1990) Decomposition of species of *Pseudocyphellaria* and *Sticta* in a southern Chilean forest. *Lichenologist* 22: 235-331.

- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK & Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.
- Harmon ME, Franklin JF, Swanson FJ, Sollins P, Gregory SV, Lattin JD, Anderson NH, Cline, SP, Aumen NG, Sedell JR, Lienkaemper GW, Cromack Jr. K & Cummins KW (1986) Ecology of coarse woody debris in temperate ecosystems. *Advances in Ecological Research* 15: 133-302.
- Harmon ME, Nadelhoffer KJ & Blair JM (1999) Measuring decomposition, nutrient turnover, and stores in plant litter. En: Robertson GP, Coleman DC, Bledsoe CS & Sollins P (editors). *Standard soil methods for long-term ecological research*: 202-240. LTER, New York, USA.
- Hedin LO, Armesto JJ & Johnson AH (1995) Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests: evaluation of biogeochemical theory. *Ecology* 76:493-509.
- Hendrickson OQ (1988) Use of acetylene reduction for nitrogen fixation in woody debris. *Soil Science Society of America Journal* 52: 840-844.
- Hendrickson OQ (1990) Asymbiotic nitrogen fixation and soil metabolism in three Ontario forests. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 967-971.
- Hicks WT, Harmon ME & Mylord DD (2003) Substrate controls on nitrogen fixation and respiration in woody debris from the Pacific Northwest, USA. *Forest Ecology and Management* 176:25-35.
- Hobbie SE (2000) Interactions between litter lignin and soil nitrogen availability during leaf litter decomposition in a Hawaiian montane forest. *Ecosystems* 3: 484-494.
- Hood GM (2000) PopTools: Software for the Analysis of Ecological Models. Available on the internet at <http://www.cse.csiro.au/poptools/>.
- Jones K & Bangs D (1985) Nitrogen fixation by free-living heterotrophic bacteria in an oak forest: the effect of liming. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 705-709.
- Jurgensen MF, Larsen MJ, Wolosiewicz M & Harvey AE (1989) A comparison of dinitrogen fixation rates in wood litter decayed by white-rot and brown-rot fungi. *Plant and Soil* 115: 117-122.
- Jurgensen MF, Graham RT, Larsen MJ & Harvey AE (1992) Clear-cutting, woody residue removal, and nonsymbiotic nitrogen fixation in forest soils of the Inland Pacific Northwest. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1172-1178.
- Kuzyakova IF, Romanenkov VA & Kuzyakov YV (2001) Application of geostatistics in processing the results of soil and agrochemical studies. *Eurasian Soil Science* 34: 1219-1228.
- Laskowski R, Niklinska M & Maryanski M (1995) The dynamics of chemical elements in forest litter. *Ecology* 76: 1393-1406.
- Legendre P, Dale MRT, Fortin MJ, Gurevitch J, Hohn M & Myers D (2002) The consequences of spatial structure for the design and analysis of ecological field surveys. *Ecography* 25: 601-615.

- Liebhold AM & J. Gurevitch J (2002) Integrating the statistical analysis of spatial data in ecology. *Ecography* 25: 553-557.
- Likens GE, Bormann FH, Pierce FH, Eaton JS & Johnson NM (1977) Biogeochemistry of a forested ecosystem. Springer-Verlag. New York. xii + 147 pp.
- Maasdorp BV (1987) Contribution of associative N₂-fixation (acetylene reduction) in some grassland ecosystems in Zimbabwe. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 7-12.
- Magill AH & Aber JD (2000) Dissolved organic carbon and nitrogen relationships in forest litter as affected by nitrogen deposition. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 603-613.
- Manly BFJ (1994) Multivariate statistical methods. Second edition. Chapman & Hall, London. xiii + 215 pp.
- Manly BFJ (1997) Randomization bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London. xx + 399 pp.
- Mann FD & Steinke TD (1989) Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with blue-green algal (cyanobacterial) communities in the Beachwood Mangrove Nature Reserve. I. The effect of environmental factors on acetylene reduction activity. *South African Journal of Botany* 55: 438-446.
- Maser C, Cline SP, Cromack Jr K, Trappe JM & Hansen E (1988) What we know about large trees that fall to the forest floor. En: Maser C, Tarrant RF, Trappe JM & Franklin JF (editors) From the forest to the sea: a story of fallen trees. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-229. Forest Service, Oregon. 153 pp.
- McGarigal K, Cushman S & Stafford S (2000) Multivariate statistics for wildlife and ecology research. Springer, New York. xiii + 283 pp.
- McNair HM (1981) Cromatografía de gases. Organización de Estados Americanos. Washington, D.C. vi + 91 pp.
- Meyer O (1994) Functional groups of microorganisms. En: Schulze ED & Mooney HA (Eds.) Biodiversity and Ecosystem function. Springer-Verlag, Berlin. pp. 67-96.
- Musacchio A, Fioretto A, Palermo AM, Guzzo S, Pellegrino G & De Santo AV (1996) Contribution of the litter and superficial soil layer to N₂ fixation, denitrification and N₂O and CH₄ emissions in a Pinus laricio Poiret forest (Sila mountains, Italy). *Pedobiologia* 40: 302-310.
- Mylona P, Pawlowski K & Bisseling T (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7: 869-885.
- Myrold DD, Ruess RW & Klug MJ (1999) Dinitrogen fixation. En: Robertson GP, Coleman DC Bledsoe CS & Sollins P (editors) Standard soil methods for long-term ecological research. LTER, New York. Pp. 241-257.
- O'Connell AM & Grove TS (1987) Seasonal variation in C₂H₂ reduction (N₂-fixation) in the litter layer of Eucalypt forests of south-western Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 135-142.
- Paul EA & Clark FE (1989) Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, Inc. San Diego, USA.

- Pepper IL & Josephson KL (1998) Molecular genetic analyses in soil ecology. En: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (editors) Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, USA. pp 168-188.
- Perakis SS & Hedin LO (2001) Fluxes and fates of nitrogen in soil of an unpolluted old-growth temperate forest, southern Chile. *Ecology* 82: 2245-2260.
- Perakis SS & Hedin LO (2002) Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds. *Nature* 415: 416-419.
- Pérez CA, Hedin LO & Armesto JJ (1998) Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics. *Ecosystems* 1: 361-373
- Pérez CA, Armesto JJ, Torrealba C & Carmona MR (2003) Litterfall dynamics and nitrogen use efficiency in two evergreen temperate rainforests of southern Chile. *Austral Ecology* 28: 591-600.
- Pérez CA, Carmona MR, Aravena JC & Armesto JJ (2004) Successional changes in soil nitrogen availability, non-symbiotic nitrogen fixation and C/N ratios in southern Chilean forests. *Oecologia*. En prensa.
- Perry DA (1994) Forest ecosystems. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Perry JN, Liebhold AM, Rosenberg MS, Dungan J, Miriti M, Jakomulska A & Citron-Pousty S (2002) Illustrations and guidelines for selecting statistical methods for quantifying spatial pattern in ecological data. *Ecography* 25: 578-600.
- Reiners WA (1981) Nitrogen cycling in relation to ecosystem succession. In: Clark FE & Roswall T (eds) Terrestrial Nitrogen Cycles. *Ecol Bull* 33. pp 507-528.
- Rosenberg MS (2003) Passage: Pattern Analysis, Spatial Statistics And Geographic Exegesis. Version 1.1. <http://lsweb.la.asu.edu/rosenberg/Passage/>.
- Rossi RE, Mulla D, Journel AG & Franz EH (1992) Geostatistical tools for modeling and interpreting ecological spatial dependence. *Ecological Monographs* 62: 277-314.
- Rosswall T (1982) Microbial regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. *Plant and Soil* 67: 15-34.
- Serrano RM (1996) Contribución de la flora epífita al ciclo de nutrientes de un bosque de Alerce en el Parque Nacional Chiloé, Chile. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Shaffer BT, Widmer F, Porteous LA & Seidler RJ (2000) Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂ fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. *Microbial Ecology* 39: 12-21.
- Silvester WB (1989) Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of pacific northwest America. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 283-289.

- Smith VC & Bradford MA (2003) Do non-additive effects on decomposition in litter-mix experiments result from differences in resource quality between litters? *Oikos* 102: 235-242.
- Sokal RR & Rohlf FJ (1981) *Biometry*. Second edition. W. H. Freeman, San Francisco, California. 859 pp.
- StatSoft Inc. (2000) *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
- Tate III RL (1995) Nitrogen fixation: the gateway to soil nitrogen cycling. En: Tate III RL (editor) *Soil microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 283-306.
- Ter Braak CJF (1994) Canonical community ordination. Part I: Basic theory and linear methods. *Ecoscience* 1: 127-140.
- Ter Braak CJF & Looman CWN (1994) Biplots in reduced-rank regression. *Biom. J.* 36: 983-1003.
- Ter Braak CJF & Prentice IC (1988) A theory of gradient analysis. *Advances in Ecological Research* 18: 271-317.
- Thompson MV & Vitousek PM (1997) Asymbiotic nitrogen fixation and litter decomposition on a long soil-age gradient in Hawaiian montane rain forest. *Biotropica* 29: 134-144.
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N & Matsuguchi T (1995) Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of Bacteriology* 177: 1414-1417.
- Vann DR, Joshi A, Pérez C, Johnson AH, Frizano J, Zarin DJ & Armesto JJ (2002) Distribution and cycling of C, N, Ca, Mg, K and P in three pristine, old-growth forests in the Cordillera de Piuchué, Chile. *Biogeochemistry* 60: 25-47.
- Veblen TT, Kitzberger T, Burns BR & Rebertus AJ (1995) Natural disturbance and regeneration dynamics in Andean forests of southern Chile and Argentina. En: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo MK (editors) *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago. pp. 169-198.
- Verdonschot PFM & Ter Braak CJF (1994) An experimental manipulation of oligochaete communities in mesocosms treated with chlorpyrifos or nutrients additions: multivariate analyses with Monte Carlo permutation test. *Hydrobiologia* 278: 251-266.
- Villagrán C (1990) Glacial climates and their effects on the history of the vegetation of Chile: a synthesis based on palynological evidence from Isla de Chiloé. *Review of Palaeobotany and Palynology* 65: 17-24.
- Vitousek PM & Hobbie S (2000) Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. *Ecology* 81: 2366-2376.
- Vitousek PM & Matson PA (1984) Mechanisms of nitrogen retention in forest ecosystems: a field experiment. *Science* 255: 51-52
- Vitousek PM, Aber JD, Horwarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH & Tilman DG (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7: 737-750.

- Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB & Sprent JI (2002) Towards and ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1-45.
- Vitousek PM, Hättenschwiler S, Olander L & Allison S (2002a) Nitrogen and nature. *Ambio* 31: 97-101.
- Wagener SM & Schimel JP (1998) Stratification of soil processes: a study of the birch forest floor in the Alaskan taiga. *Oikos* 81: 63-74.
- Wagner GH & DC Wolf (1998) Carbon transformations and soil organic matter formation. En: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (editors). *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall. New Jersey. pp 218-258.
- Weathers KC, Lovett GM, Likens GE & Caraco NFM (2000) Cloudwater inputs of nitrogen to forests ecosystems in southern Chile: Forms, fluxes, and sources. *Ecosystems* 3: 590-595.
- Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA & Seidler RJ (1999) Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 374-380.
- Woitchik AF, Ohowa B, Kazungu JM, Rao RG, Goeyens L & Dehairs F (1997) Nitrogen enrichment during decomposition of mangrove leaf litter in an east African coastal lagoon (Kenya): Relative importance of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 39: 15-35.
- Zar JH (1996) *Biostatistical analysis*. Third Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River. x + 122 pp.
- Zuberer DA (1998) Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic. En: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (editors) *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, USA. pp. 295-321.

APÉNDICE A

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ESPACIAL DE LA FIJACIÓN NO-SIMBIÓTICA DE N₂ POR MEDIO DE HERRAMIENTAS DE LA GEOESTADÍSTICA

La mayoría de los fenómenos ecológicos presentan alguna dependencia con el espacio, y los procesos biogeoquímicos no son la excepción. En particular, la complejidad estructural de los ecosistemas de bosques antiguos (Perry 1994) sugiere la existencia de patrones espaciales a pequeña escala (< 1 ha) en propiedades del suelo relevantes para la actividad microbiana, tales como aquellos documentados para bosques de llanuras de inundación (Gallardo 2003) y suelos agrícolas (Kuzyakova et al. 2001). En este apéndice se describen los resultados del análisis espacial de los datos de la actividad diazotrófica estival (estimada por reducción de acetileno) en la capa de hojarasca del bosque templado del Parque Nacional Chiloé en el cual se utilizaron dos herramientas de la geoestadística que complementan la prueba de Mantel (Capítulo I, sección I.3.2).

Análisis espacial

El análisis estadístico de la influencia de la ubicación espacial sobre la variable ecológica de interés tiene un doble propósito. Por un lado busca estimar la magnitud de la **autocorrelación espacial** de los datos, para deducir el grado de dependencia entre muestras espacialmente cercanas. La independencia entre muestras es un supuesto básico para cualquier prueba estadística convencional, como es el caso de la regresión múltiple o la

correlación simple (Sokal & Rohlf 1981, Fortin & Gurevitch 1993). En consecuencia, la correcta aplicación de tales pruebas estadísticas requiere la ausencia de autocorrelación espacial, o bien corregir o descontar sus efectos (Legendre et al. 2002). El segundo propósito del análisis espacial, mucho más interesante que el anterior, es describir el patrón espacial en sí mismo. Tal descripción es una potente herramienta para explicar los mecanismos que generan los patrones y procesos ecológicos (Rossi et al. 1992, Fortin & Gurevitch 1993, Liebhold & Gurevitch 2002, Perry et al. 2002) y permite aplicar técnicas de interpolación necesarias para obtener mapas detallados de la distribución espacial de la variable de interés (Rossi et al. 1992). La existencia de un patrón espacial implica que la distribución espacial de la variable de interés es distinta de lo esperado por azar, observándose sectores —o parches— con valores altos y parches con valores bajos (Dale 1999). La identificación de la escala a la cual ocurren estos parches, es decir, la escala a la cual ocurre la dependencia espacial es el objetivo de muchos métodos de la estadística espacial y geoestadística (Dale 1999, Dale et al. 2002).

Los datos de tasa de reducción de acetileno in situ fueron analizados mediante las siguientes herramientas de la geoestadística:

i) Semivariograma isotrópico.

Es un diagrama de la variabilidad en función de la distancia de separación entre pares de muestras, separadas por intervalos de distancias en cualquier dirección que se obtiene calculando la semivarianza γ según la siguiente ecuación (Rossi et al. 1992):

$$\gamma(h) = \frac{1}{2N(h)} \cdot \sum_{i=1}^{N(h)} (z_i - z_{i+h})^2$$

donde $\gamma(h)$ es la semivarianza para el intervalo de clase de distancia h ; z_i es el valor de la variable de interés (en este caso z = Tasa de Reducción de Acetileno) en la muestra ubicada en el punto i ; z_{i+h} es el valor de la variable de

interés en la muestra ubicada en un punto separado a una distancia h del punto i ; y $N(h)$ es el número total de pares de muestras para el intervalo de clase de distancia h .

En la Figura A1 se ilustra el comportamiento típico de un semivariograma. La ausencia de patrón espacial produce un semivariograma plano (modelo aleatorio), mientras que la existencia de un patrón espacial produce un semivariograma curvo a distancias inferiores a una distancia A_0 llamada "Rango" (modelo esférico). A medida que la separación entre muestras aumenta, la dependencia espacial es cada vez menor hasta que se alcanza la varianza o semivarianza total o "Sill". Esta varianza total tiene dos componentes: la varianza "Estructural" (C) explicada por la distancia entre muestras y la varianza intrínseca de los datos o varianza "Nugget" (C_0). El modelo esférico es una función matemática utilizada comúnmente para "ajustar" los variogramas y estimar los parámetros ya mencionados, definida por la siguiente ecuación (programa GS+):

$$\gamma(h) = \begin{cases} C_0 + C \left[\frac{3}{2} \cdot \left(\frac{h}{A_0} \right) - \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{h}{A_0} \right)^3 \right] & \Leftrightarrow h \leq A_0 \\ C_0 + C & \Leftrightarrow h > A_0 \end{cases}$$

ii) Correlograma de índice de Moran (I) y de Geary (c).

Método muy relacionado con el anterior (Dale et al. 2002). En este caso se mide directamente la correlación o asociación entre valores de muestras separadas a una distancia h . En presencia de un patrón espacial se espera que las muestras más cercanas presenten una mayor correlación o autocorrelación. La interpretación de los correlogramas es muy similar a la de los variogramas, es decir, correlogramas planos indican una distribución aleatoria de los datos y ausencia de patrón espacial, mientras que correlogramas curvos o fluctuantes sugieren algún tipo de dependencia con el espacio o separación entre

muestras. Este método permite evaluar la significancia estadística de la autocorrelación en cada intervalo de distancia h (Perry et al. 2002).

Se utilizaron los datos de TRA (Tasa de Reducción de Acetileno) *in situ* de Enero y Diciembre del 2001. Los semivariogramas y ajustes de modelo esférico, fueron realizados con el programa GS+ (versión 5.3.1 demo), y los correlogramas, con el programa Passage (Rosemberg 2003).

Resultados

Los semivariogramas correspondientes a los ensayos de Enero y Diciembre del 2001 tuvieron un aspecto relativamente plano, no observándose ninguna dependencia marcada de la semivarianza con la distancia entre muestras (Figura A2). Sin embargo, el ajuste del modelo esférico fue considerable para Enero del 2001 ($R^2 = 0.56$), pero bastante bajo para Diciembre del 2001 ($R^2 < 0.001$).

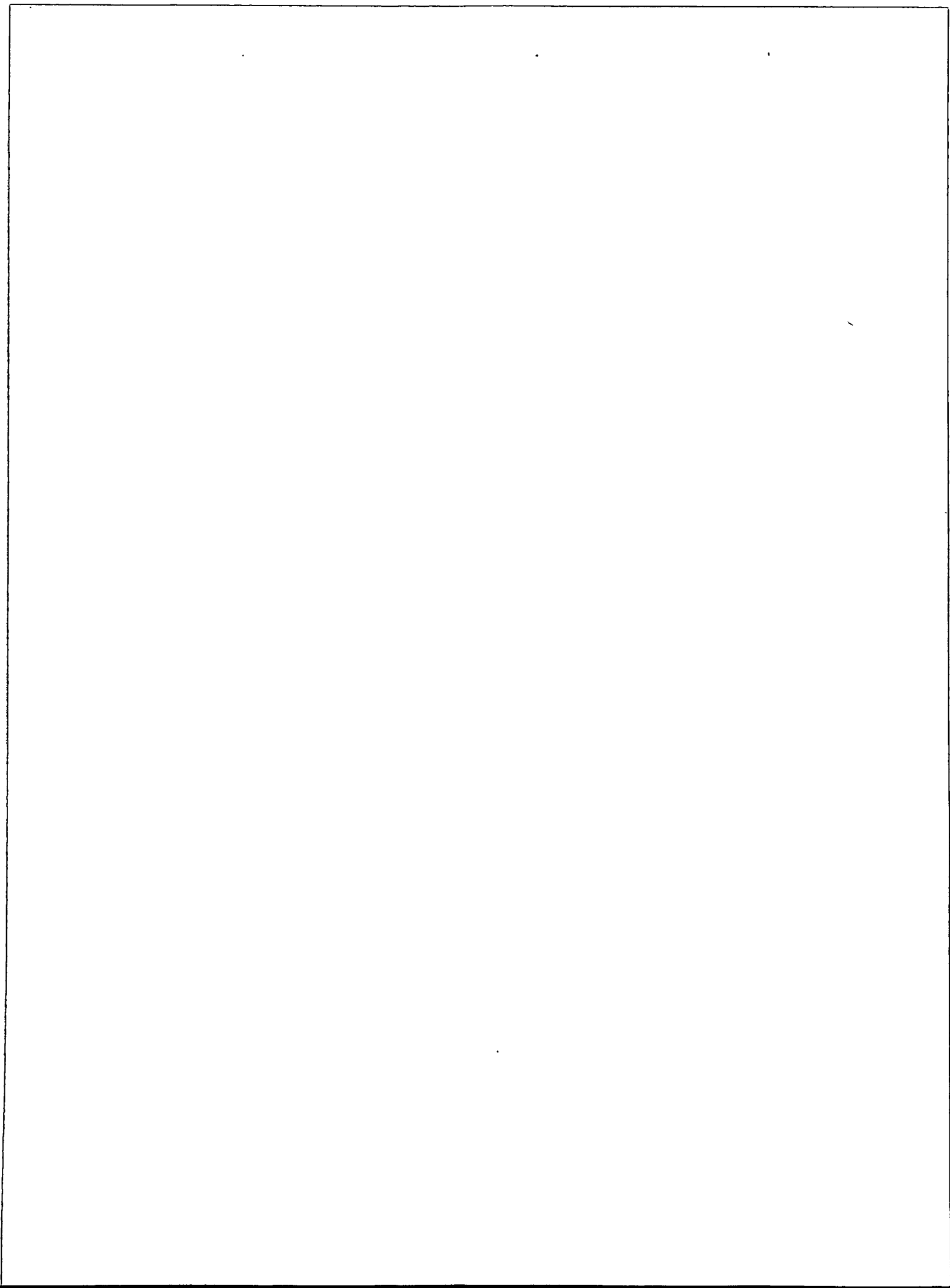
Los correlogramas de Moran y Geary también mostraron la misma tendencia, es decir, no existió ninguna distancia entre muestras tal que se observara una correlación significativa entre los respectivos valores de TRA, salvo el pico significativo de correlación observado a los 79.5 m de distancia en el correlograma de Geary de Diciembre 2001 (Figura A3).

Discusión

Como muchos otros fenómenos y variables ambientales del bosque templado, la fijación no-simbiótica de N_2 en la hojarasca resultó ser tremendamente variable en el espacio, a escala intra-rodal. Sin embargo, no se encontró una influencia significativa del espacio sobre la tasa de reducción de acetileno *in situ*. El patrón indicado por los variogramas y correlogramas fue congruente con los resultados de la prueba de Mantel (sección 1.3.2). La ausencia de autocorrelación espacial significa que la magnitud de la variable de

interés no depende de su posición en el espacio, por lo cual los puntos más cercanos no necesariamente tienen valores de reducción de acetileno más similares. Sin embargo, esta conclusión sólo es válida bajo el diseño de muestreo empleado. En este caso, los puntos de muestreo se ubicaron en forma regular a lo largo de transectos paralelos, con 10 metros de separación entre ellos (ver sección II.4.1). En consecuencia, no hay motivos suficientes para descartar la existencia de autocorrelación espacial de la tasa de fijación biológica de N_2 en la capa de hojarasca del bosque estudiado a distancias entre puntos menores que 10 metros. Es probable que la influencia del espacio se dé a escalas menores que 10 m, debido al reducido tamaño de los organismos que gobiernan el proceso (bacterias diazótrofes). El Rango (A_0) estimado por el ajuste de modelo esférico fue 15.3 m y 9.5 m para Enero y Diciembre del 2001, respectivamente (Figura A2). En un estudio detallado en el suelo de un bosque de inundación del noroeste de España se estimaron valores de A_0 para 21 variables fisicoquímicas relevantes para la actividad microbiana (Gallardo 2003), que fluctuaron entre 18.5 m y 3.9 m, siendo el 81% inferior a 10 m. Por otra parte, estudios de propiedades edáficas en suelos agrícolas han demostrado que la influencia del espacio se da a distancias de 20 a 120 m (Kuzyakova et al. 2001), sin embargo estos sistemas manejados son mucho más homogéneos que el complejo hábitat del bosque templado antiguo.

El aspecto plano de los variogramas y correlogramas también puede indicar que el patrón espacial ocurre a escalas muy superiores al área muestreada (0.4 ha). Cabe la posibilidad de que el rango de distancias abarcado en los variogramas (~90 m) sea tan pequeño, que la varianza detectada corresponda al "Nugget" o varianza intrínseca de un patrón espacial mucho más grande (V. Marín, comunicación personal). Esta tesis se centró en el estudio de la actividad diazotrófica de la hojarasca a escala intra-rodal, sin embargo es factible que de existir un patrón espacial para este proceso, éste se de a una escala muy superior, siendo necesario incluir más sitios de bosque



Nordpatagónico en la cordillera de la costa de Chiloé, dentro del Parque Nacional Chiloé.

Conclusión

Los resultados expuestos no fueron suficientes para describir el patrón espacial del proceso de FNS de la detritósfera del bosque templado estudiado. Para obtener una descripción correcta de este patrón, y el de otros procesos mediados por microorganismos del suelo, sería necesario tanto reducir como ampliar la escala de análisis, es decir, considerar distancias de separación entre muestras inferiores a 10 m y superiores a 90 m.

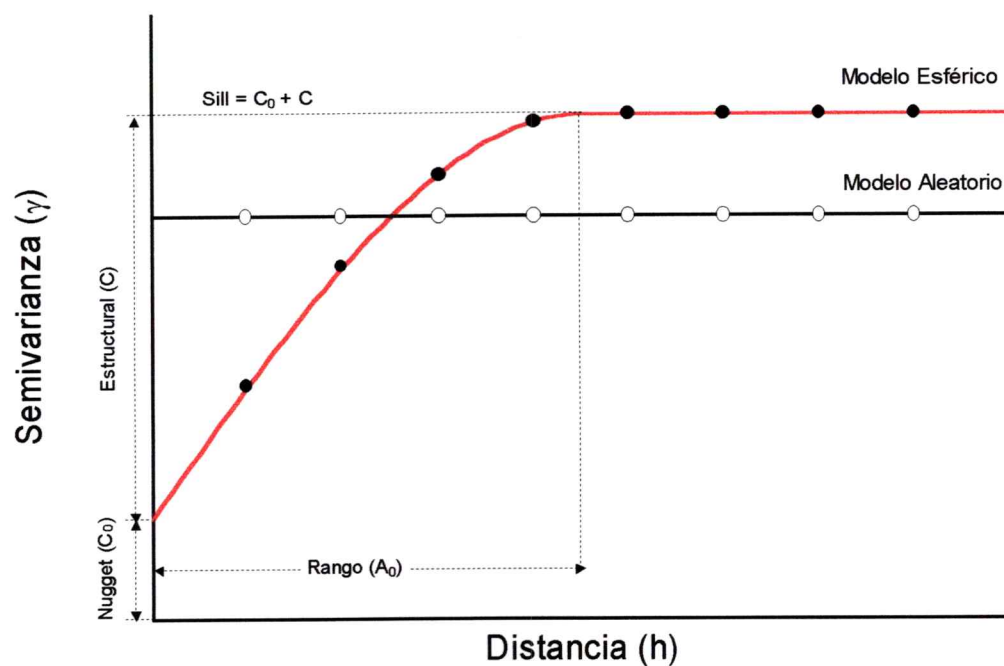


Figura A1

Semivariograma generalizado (línea roja y puntos negros), mostrando el significado de los distintos parámetros del modelo esférico y comparación con un modelo aleatorio (línea negra y puntos blancos) (modificado de Gallardo 2003).

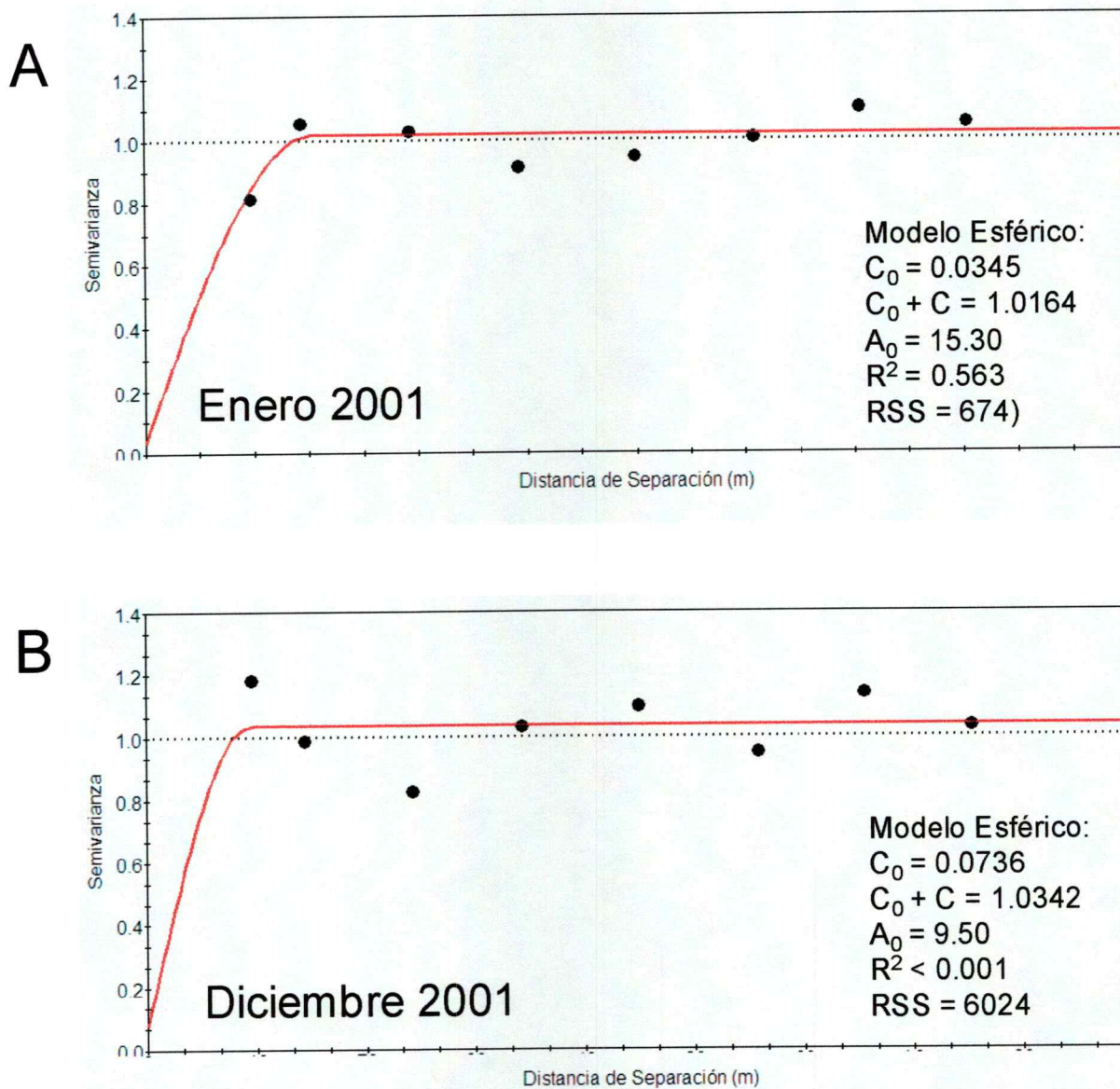


Figura A2

Semivariogramas isotrópicos estandarizados (con respecto a varianza total) de TRA *in situ* de Enero (**A**) y Diciembre del 2001 (**B**). Línea punteada: varianza total unitaria; línea roja: ajuste de modelo esférico. Parámetros de modelo esférico C_0 : varianza de Nugget; C : varianza Estructural, A_0 : Rango. RSS: suma de cuadrados residual.

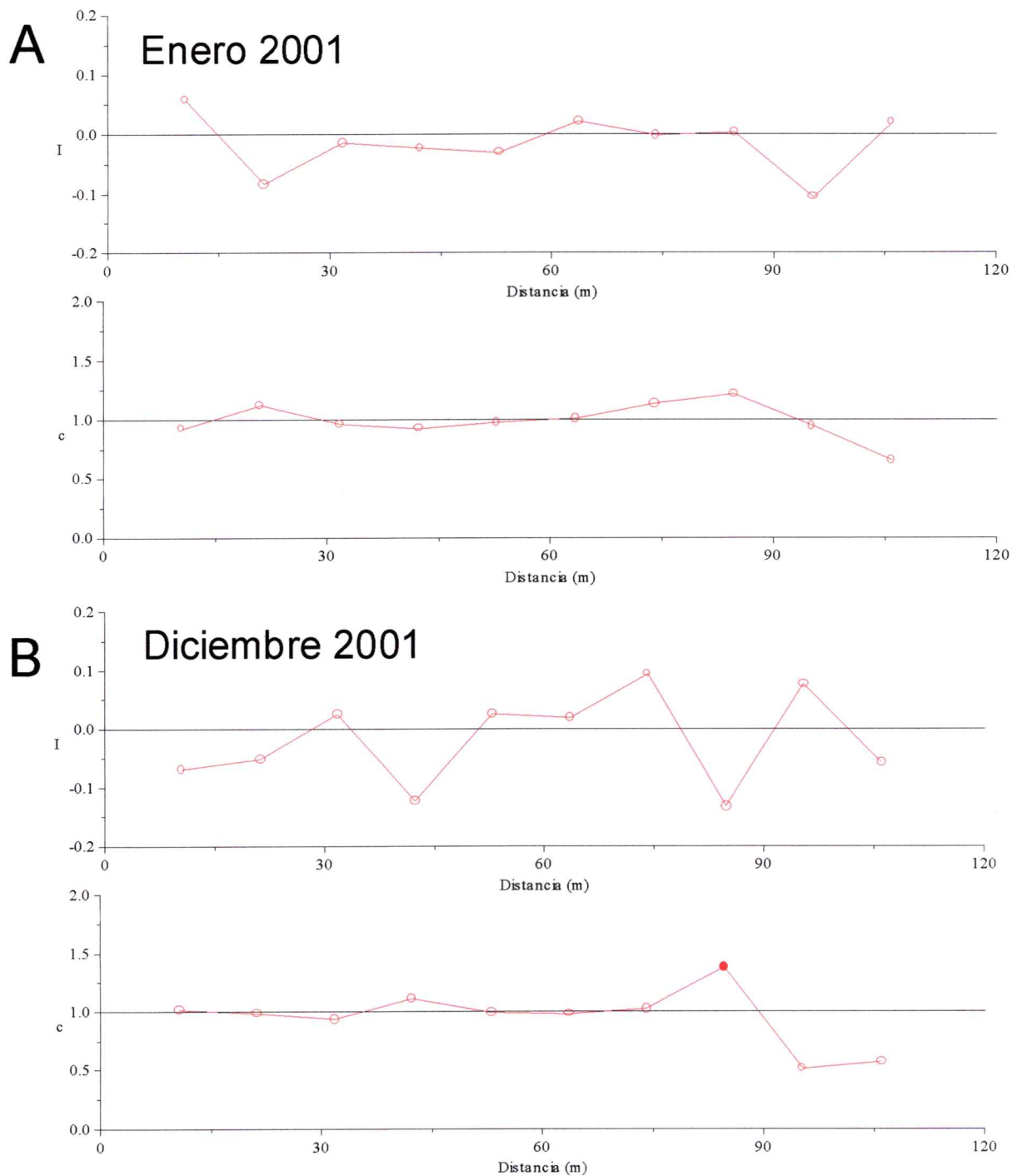


Figura A3

Correlogramas de Moran y Geary de la tasa de reducción de acetileno (TRA) *in situ* de Enero 2001 (A) y Diciembre del 2001 (B). Simbología: círculos negros corresponden a correlaciones estadísticamente significativas y círculos transparentes indican ausencia de correlación significativa.